

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen, Anatomie I

eingereicht über das
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die Bedeutung von TRPC-Kanälen in der Muskarin-vermittelten Kontrolle
peripherer Atemwege der Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Nicole Struckmann
Tierärztin aus Mainz

Gießen 2006

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen, Anatomie I

eingereicht über das
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Bergmann

**Die Bedeutung von TRPC-Kanälen in der Muskarin-vermittelten Kontrolle
peripherer Atemwege der Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Nicole Struckmann
Tierärztin aus Mainz

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kummer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2006

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Aufbau des Atmungsapparates	3
2.1.1. Lappengliederung der Lunge	3
2.1.2. Der Bronchialbaum der Lunge des Menschen.....	4
2.1.3. Aufbau luftleitender Abschnitte muriner Atemwege	6
2.2. Die neuronale Kontrolle der unteren Atemwege	7
2.2.1. Parasympathische Innervation.....	8
2.2.2. Sympathische Innervation	9
2.2.2.1. Wirkung von Noradrenalin auf die Atemwege.....	10
2.2.3. Sensible Innervation	11
2.2.4. Nicht-adrenerges, nicht-cholinerges-System	12
2.3. Acetylcholin	13
2.3.1. Synthese von Acetylcholin	13
2.3.1.1. Neuronales Acetylcholin	13
2.3.1.2. Nicht-neuronales Acetylcholin	14
2.3.2. Rezeptoren für Acetylcholin	15
2.3.2.1. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	15
2.3.2.2. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	15
2.3.3. Acetylcholin in der Lunge.....	16
2.3.3.1. Quellen für Acetylcholin in der Lunge	16
2.3.3.2. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren in der Lunge.....	16
2.3.3.3. Wirkung von Acetylcholin auf die Atemwege	17
2.4. Signalwege muskarinischer Acetylcholinrezeptoren	18
2.4.1. Funktionale Kopplung von G-Proteinen	19
2.4.1.1. Phospholipase C	19
2.4.1.2. Adenylatzyklase.....	20
2.4.1.3. Phospholipase A ₂	20
2.4.1.4. Phospholipase D	21
2.4.2. Kalziumfreisetzung	22
2.4.3. Die Konstriktion im glatten Muskel.....	23
2.4.4. Signalwege muskarinischer Rezeptoren in den Atemwegen	24
2.5. Kalziumkanäle in der Zellmembran	25
2.6. Transiente Rezeptorpotential-Kanäle.....	25
2.6.1. Transientes Rezeptorpotentialprotein vom „Canonical-Typ“	27
2.6.1.1. TRPC1	28
2.6.1.2. TRPC4 und TRPC5	28
2.6.1.3. TRPC3, TRPC6 und TRPC7	28
2.6.1.4. TRPC2.....	28
2.6.1.5. Vorkommen der TRPC-Proteine in der Lunge	29
2.6.2. Transientes Rezeptorpotentialprotein vom „Vanilloid-Typ“	29
2.6.3. Transientes Rezeptorpotentialprotein vom „Melastatin-Typ“	30

3. MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1. Material	31
3.1.1. Tiere	31
3.1.2. Pharmaka	31
3.1.2.1. U 46619	31
3.1.2.2. Muskarin-Chlorid	31
3.1.2.3. Thapsigargin	31
3.1.2.4. SKF 96365	32
3.1.2.5. Verapamil	32
3.1.2.6. Nitroprussid-Natrium	32
3.1.3. Lösungen und Zellkulturmedien	32
3.1.3.1. Aqua ad injectabilia (Ampuwa®)	32
3.1.3.2. Spüllösung für die Gefäße	32
3.1.3.3. Agarose	33
3.1.3.4. EARLE`s Minimal Essential Medium	33
3.1.3.5. Krebs-Ringer-Lösung	33
3.1.3.6. Phosphate buffered saline (PBS)	33
3.1.3.7. Paraformaldehyd (PFA) 4 %	34
3.1.3.8. Phosphatpuffer	34
3.1.3.9. gepuffertes Glycerol	34
3.1.3.10. DNase I Reaktionspuffer	34
3.1.3.11. 10 x PCR Puffer II	34
3.1.3.12. 5 x First-Strand Puffer	34
3.1.4. Antiseren	35
3.1.5. Primer	36
3.2. Methoden	37
3.2.1. Videomorphometrie	37
3.2.1.1. Präparation der Maus	37
3.2.1.2. Gewebepräparation	37
3.2.1.3. Aufbewahrung der Gewebepräparate	38
3.2.1.4. Videomikroskopische Untersuchungen der Gewebepräparate	38
3.2.1.5. Bilderfassung und Bildverarbeitung	39
3.2.1.6. Bildauswertung	40
3.2.2. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	41
3.2.2.1. Reverse Transkriptase	41
3.2.2.2. Polymerase Kettenreaktion	42
3.2.3. Immunhistochemie	43
3.2.3.1. Gewebepräparation der Maus	43
3.2.3.2. Anfertigung der Gefrierschnitte	43
3.2.3.3. Fixierung und Färbung	43
3.2.3. Statistische Auswertung	44
4. ERGEBNISSE	45
4.1. Videomikroskopisch untersuchte Lungenschnitte	45
4.1.1. Kontrollversuche	46
4.1.2. Blockade der intrazellulären Kalziumspeicher	48
4.1.3. Einfluss spannungsabhängiger Kalziumkanäle	49
4.1.4. Einfluss spannungsunabhängiger Kalziumkanäle	51

4.1.5.	Blockade von intra- und extrazellulären Kalziumspeichern.....	52
4.1.6.	Beteiligung von TRPC-Kanälen	53
4.2.	Expression von TRPC-Proteinen in der Mäuselunge	55
4.2.1.	Nachweis der mRNS von TRPC-Proteinen in der Mäuselunge mittels reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion.....	55
4.2.2.	Immunhistochemischer Nachweis von TRPC-Proteinen in der Lunge.....	56
5.	DISKUSSION	58
6.	ZUSAMMENFASSUNG	68
7.	SUMMARY	70
8.	LITERATURVERZEICHNIS	71
9.	ANHANG.....	90
9.1	Eigene Veröffentlichungen	90
DANKSAGUNG		91

Abkürzungsverzeichnis

<i>A., Aa.</i>	<i>Arteria, Arteriae</i>
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ATP	Adenosintriphosphat
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin-Gen-abhängige-Peptid
ChAT	Cholinacetyltransferase
DAG	Diaminoglycerol
e-NANC	exzitatorisches NANC-System
eNOS	endotheliale NOS
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.): und andere
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindende Regulatorproteine
GTP	Guanosintriphosphat
i-NANC	inhibitorisches NANC-System
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP ₄	Inositol-1,3,4,5-Tetraphosphat
IP ₅	Inositol-1,3,4,5,6-Pentaphosphat
IP ₆	Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexaphosphat
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MLC ₂₀	(Myosin-light-chain) leichte Kette des Myosins (M _r 20,000)
MLCKII	(Myosin-light-chain-kinasell) Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
<i>N.</i>	<i>Nervus</i>
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg

NKA	Neurokinin A
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
nNOS	neuronale NOS
NPY	Neuropeptid Tyrosin
OCT	organische Kationentransporter
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RAR	(rapidly adapting receptors) schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren
ROCC	(receptor-operated calcium channel) Rezeptor-abhängiger Kalziumkanal
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SAR	(slowly adapting receptors) langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren
SEM	Standartabweichung des Mittelwerts
SMOCC	(second messenger-operated calcium channel) second messenger-abhängiger Kalziumkanal
SOCC	(store-operated calcium channel) speicherabhängiger Kalziumkanal
SP	Substanz P
TRP	(transient receptor potential) transientes Rezeptorpotential
TRPC	TRP vom „Canonical-Typ“
TRPM	TRP vom „Melastatin-Typ“
TRPV	TRP vom „Vanilloid-Typ“
VACHT	vesikulärer Acetylcholintransporter
V., Vv	<i>Vena, Venae</i>
VICC	(voltage-insensitive calcium channel) spannungsunabhängiger Kalziumkanal
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VOCC	(voltage-operated calcium channel) spannungsabhängiger Kalziumkanal
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Obstruktive Lungenerkrankungen wie das *Asthma bronchiale* beruhen auf einer abnormen Reaktivität der Atemwege auf Bronchokonstriktoren. Der von parasympathischen Nervenfasern freigesetzte Transmitter Acetylcholin (ACh) ist der wichtigste neurogene Bronchokonstriktor. ACh reagiert in der Lunge mit Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR) auf glatten Muskel- und Epithelzellen. Elektrische Stimulationen des *Nervus vagus* bei Katzen und Hunden zeigen jedoch, dass lediglich die oberen Atemwege bis zu den großen Bronchien, nicht jedoch die peripheren Atemwege einer parasympathischen Kontrolle unterliegen (Wessler & Kirkpatrick 2001). Damit scheint das aus parasympathischen Nervenzellen freigesetzte ACh bei der Vermittlung der Konstriktion der peripheren Atemwege eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings wird ACh auch von zahlreichen nicht-neuronalen Zellen gebildet (Wessler & Kirkpatrick 2001, Pfeil et al. 2003) und kann so lokale Wirkungen auf umliegende Myozyten entfalten. Dies erklärt auch, warum in Geweben, die nicht von cholinergen Neuronen innerviert sind, mAChR vorhanden sind (Wessler et al. 1998). Spezifische Wirkungen dieser nicht-neuronalen ACh-Freisetzung in peripheren Atemwegen sind bislang nur unzureichend untersucht.

Die Veränderungen des Atemwegswiderstandes werden zu einem erheblichen Teil vom Durchmesser der kleineren, peripheren Atemwege bestimmt (Martin 2002, Escolar et al. 2003). Obgleich dem peripheren Bereich der Atemwege eine besondere Bedeutung bei der Pathogenese obstruktiver Lungenerkrankungen zugeschrieben wird, ist über den Effekt und die Signaltransduktionswege des Bronchokonstriktors ACh in den kleinen Atemwegen, verglichen mit Trachea und Stammbronchien, nur wenig bekannt. Mit Hilfe von Lungenpräzisionsschnitten durch unterschiedliche Ebenen der peripheren Atemwege sollten Reaktionen nach Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gemessen und Auswirkungen auf den gesamten Gewebeverband aufgezeigt werden. Parallel zu den funktionellen Nachweisen von mAChR auf peripheren Atemwegen mittels Muskarin-vermittelter Konstriktionen sollten die der AChR-Aktivierung nachfolgenden Signalwege genauer untersucht werden. Hierbei bildeten die für eine intrazelluläre Kalziumerhöhung verantwortlichen Signalwege den Gegenstand der Untersuchung.

Von den zentralen Atemwegen weiß man, dass die cholinerge Konstriktion biphasisch abläuft. Sie beginnt mit einer schnellen Initialkonstriktion, die von einer tonischen

Konstriktion gefolgt ist (Rodger 1985). Während die Initialkonstriktion in den zentralen Atemwegen durch die Inositol-1,3,4-Trisphosphat (IP_3)-induzierte, intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) vermittelt ist (Kajita & Yamaguchi 1993), unterliegt die zweite Phase in Teilen dem Einstrom extrazellulären Kalziums durch Kalzium-permeable Kanäle.

Dafür sind auf glatten Muskelzellen unterschiedliche Kanaltypen vorhanden, die sich durch ihren Aktivierungsmechanismus unterscheiden. Welche Kanäle in den Muskelzellen peripherer Atemwege die Konstriktion nach Stimulation mACHR vermitteln und welcher Aktivierungsmechanismen ihnen zugrunde liegt, ist unklar. Als aussichtsreiche Kandidaten membranständiger Kalziumkanäle gelten die transienten Rezeptorpotential-Kanalproteine vom „Canonical Typ“ (TRPC). Eine Beteiligung von TRPC-Kanalproteinen am KalziumEinstrom nach mACHR-Stimulation wurde bisher an transfizierten Zellen beschrieben (Montell 2001). Zur Charakterisierung spezieller TRPC-Kanalproteine in peripheren Atemwegen sollte unabhängig von den videomorphometrischen Funktionalitätsstudien TRPC Protein zusätzlich auf transkriptioneller Ebene mittels RT-PCR sowie auf Proteinebene mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Aufbau des Atmungsapparates

Der Atmungsapparat ermöglicht den Gasaustausch. Dafür sind die Lungen, *Pulmones*, ausgebildet, die durch die Atembewegungen frische, sauerstoffreiche Luft aufnehmen und ausgetauschte, kohlendioxidreiche Luft wieder abgeben. Die Luftwege des Atmungsapparates gliedern sich in die oberen und unteren Atemwege. Die oberen Atemwege umfassen die Nasenhöhle und den Rachen. Die unteren Atemwege beginnen mit dem Kehlkopf und setzen sich über die Luftröhre in das Bronchialsystem der Lunge fort. Das Bronchialsystem unterteilt sich in einen proximalen konduktiven, d. h. nur luftleitenden Bronchialbaum und in einen distalen, mit Alveolen besetzten, Gasaustauschenden Abschnitt. In den Lungenbläschen oder Alveolen findet der Gasaustausch durch Diffusion zwischen der eingeatmeten Luft und dem Blut in den Lungenkapillaren statt (Benninghoff 2002).

Das funktionelle Blutgefäßsystem, die *Vasa publica* der Lunge, beginnt mit dem aus dem rechten Herzen entspringenden *Truncus pulmonalis*. Seine Äste folgen der Verzweigung des Bronchialbaums und führen das mit CO₂ angereicherte Blut dem Kapillarnetz der Lungenalveolen zu. Dort erfolgt der Austausch gegen Sauerstoff, worauf das Blut über die *Venae (Vv.) pulmonales* der linken Vorkammer des Herzens zugeführt wird.

Die Fasern der fibroelastischen Eigenschicht der Lungenkapsel, der *Pleura pulmonalis*, dringen in das Organ ein und stellen als inter- und intralobuläres sowie peribronchiales und perivaskuläres Bindegewebe das Interstitium der Lunge dar. Es gibt dem Lungengewebe die große Ausdehnungs- und Retraktionsfähigkeit für den Atmungsvorgang. Bei der Inspiration werden die elastischen Fasern gedehnt, bei der Expiration, retrahieren sich die elastischen Elemente der Lunge und bringen so die Luft zum Entweichen. Dieser Vorgang wird bei angestrenzter Atmung durch die Bauchmuskulatur unterstützt (Nickel et al. 1987).

2.1.1. Lappengliederung der Lunge

Eine Untergliederung des Lungengewebes in einzelne Lungenlappen, *Lobi pulmonis*, tritt bei vielen Säugetieren durch Einziehungen der *Pleura visceralis* auf. Der rechte Lungenflügel des Menschen besteht in der Regel aus drei, der linke aus zwei

Lungenlappen. Beide Lungenflügel besitzen einen Oberlappen, *Lobus superior*, und einen Unterlappen, *Lobus inferior*. Auf der rechten Seite fügt sich ein Mittellappen, *Lobus medius*, zwischen Ober- und Unterlappen ein.

Im Gegensatz zum Menschen ist bei der Maus der linke Lungenflügel nicht untergliedert. Er erstreckt sich über die gesamte cranio-caudale Länge der linken Pleurahöhle.

Der rechte Lungenflügel der Maus ist in einen rechten Oberlappen, einen rechten Mittellappen, einen infrakardialen Lappen und einen rechten unteren Lappen unterteilt. Der infrakardiale Lappen liegt in einer Fortsetzung der rechten Pleurahöhle unter dem Herzen und ragt damit zu einem großen Teil auf die linke Seite des Thorax (Valerius 1996).

2.1.2. Der Bronchialbaum der Lunge des Menschen

Der menschliche Bronchialbaum wird als eine Folge von Gabelungen (Dichotomie) beschrieben (Boyden 1975, Starck 1975, Phalen et al. 1978, Horsfield 1991) und von Weibel als grundsätzliches Modell der Säugetierlunge benannt (Weibel 1963, Weibel 1991). Demnach gehen aus der Luftröhrengabelung, *Bifurcatio tracheae*, zwei kurze Hauptbronchien, *Bronchi principales*, hervor, die den Beginn des konduktiven Bronchialbaums darstellen. Diese teilen sich sogleich nach ihrem Eintritt in die Lunge rechterseits und linkerseits in die Lappenbronchien, *Bronchi lobares*. Aus den Lappenbronchien gehen die Segmentbronchien, *Bronchi segmentales*, hervor. Der rechte Oberlappen besitzt drei und der rechte Mittellappen zwei Segmentbronchien. Der diesen beiden entsprechende linke Oberlappen besitzt ebenfalls fünf Segmentbronchien. Der rechte Unterlappen wird von fünf Segmentbronchien, der linke Unterlappen in der Regel nur von vier Segmentbronchien versorgt. Die Segmentbronchien zweigen sich nach sechs bis zwölf Aufzweigungen zuerst in weitere mittlere Bronchi, dann in die kleinen Bronchi auf. Auf diese kleinen Bronchien folgen die Bronchioli, denen alle Knorpelelemente fehlen und die mit ihren Aufzweigungen jeweils ein Lungenläppchen, *Lobulus pulmonis*, versorgen. Die Bronchioli teilen sich drei- bis viermal gleichmäßig dichotom und bilden mit ihren letzten Ästen, den *Bronchioli terminales*, das Ende des konduktiven Bronchialbaumes. Daran schließt sich der respiratorische Bronchialbaum mit seinen *Bronchioli respiratorii* an, die bläschenförmige Ausbuchtungen, die Alveolen, besitzen. Kurz hintereinander teilen sie sich noch ein- bis zweimal, um dann in die rundum mit

Alveolen besetzten Alveolengänge, die *Ductuli alveolares* und deren endständige Teilungsgebilde, die Alveolensäckchen *Sacculi alveolares*, zu führen (Benninghoff 2002).

Die Innenauskleidung der Atemwege wird von einer dem Atmungsweg eigenen Schleimhaut gebildet, der histologische Aufbau variiert von proximal nach distal. In der Trachea und den proximalen Bronchi ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel auf einer gut entwickelten Lamina propria aus lockerem Bindegewebe mit zahlreichen elastischen Fasern zu finden. Das Epithel setzt sich aus Basalzellen, zilientragenden Epithelzellen und verschiedenen nicht-zilientragenden Epithelzellen zusammen (Plopper et al. 1983). Die nicht-zilientragenden, sekretorischen Epithelzellen werden anhand ihrer Sekretgranula in muköse (Becher-), sero-muköse und seröse Zellen eingeteilt. Zu ihnen gehören auch Clarazellen und die bei Mensch und Affe beschriebenen kleinen, muköse Zellen, die sekretorische Granula enthalten (Small Mucous Granule Cell, SMGC; Wilson et al. 1984, Plopper et al. 1989). In Intermediärzellen sind keine sekretorischen Granula zu finden, daher werden sie auch als degranulierte exokrine Zellen bezeichnet. Die Granula der ebenfalls vorhandenen neuroendokrinen Zellen enthalten Neuropeptide. Neben den zilientragenden Epithelzellen sind auch wenige Bürstenzellen im oberen Atemwegsepithel zu finden, die aber nicht mehr als ein Prozent der Zellpopulation ausmachen. Das Epithel wird in den Bronchiolen einschichtig und flacher. Die dominierenden sekretorischen Zellen der Bronchiolen sind Clarazellen (Plopper et al. 1983). Die Histologie dieser Zellen wurden erstmals von Clara (Clara 1937) bei Mensch und Kaninchen beschrieben. Diese auch Nischenzellen genannten Epithelzellen enthalten Membran-gebundene sekretorische Körnchen, deren Gehalt an Glycogen variiert und spezieabhängig ist (Plopper et al. 1980). Sie dienen als Stammzellen im Bronchialepithel und sezernieren verschiedene Substanzen, die eine Schutzfunktion für das Bronchialepithel darstellen. Dazu gehört das 16 kDa Clara Zell Protein, dem eine protektive Rolle bei entzündlichen Veränderungen der Atemwege zugeschrieben wird (Broeckeaert & Bernard 2000). Die anfänglich noch in der *Lamina propria mucosae* vorkommenden gemischten Drüsen sind in den kleinen Bronchien kaum noch zu finden und verschwinden in den Bronchiolen gänzlich. In der Trachea und den großen Bronchien ist zwischen Schleimhaut und Faserhaut eine Schicht glatter Muskulatur eingefügt, die aus anfänglich zirkulär, später schraubig verlaufenden Muskelfasern besteht und mit den *Bronchioli respiratorii* ausläuft. Im Bereich der Alveolen finden sich nur einzelne

Muskelfasern an den Rändern der Alveolarsepten. Die in Trachea und Stammbronchien vorkommenden Knorpelspangen sind in den Bronchien nur noch als nach distal abnehmende Fragmente zu finden. Die Bronchioli weisen keine Knorpelfragmente mehr auf (Nickel 1987).

2.1.3. Aufbau luftleitender Abschnitte muriner Atemwege

Das in der menschlichen Lunge existente Verzweigungsmuster wurde auch auf andere Säugetiere übertragen. Autoren, die ihre Ergebnisse v. a. an Tieren erarbeiteten, gliedern die Luftwege der Lungen vieler Säugetierarten in Haupt- und Nebenachsen und beschreiben den Bronchialbaum als monopodial gegliederte Struktur (Aeby 1880, Narath 1901, Nakakuki 1975, Nakakuki 1983, Koblinger & Hofmann 1988). Der luftleitende Bronchialbaum besteht demnach aus einem Stammbronchus, welcher in der Hauptachse von der Bifurkation schräg zum Diaphragma verläuft. Von ihm entspringen Nebenbronchen in drei Reihen, welche Nebenachsen mit gleichem Aufbau, also mit Nebenbronchen in drei Reihen bilden. Auch in den Lungen der Nagetiere erscheint die Struktur des Bronchialbaumes monopodial gegliedert (Valerius 1996).

Der rechte Hauptbronchus, der an der Bifurkation beginnt, bildet die durchgehende Hauptachse des rechten Lungenflügels. Er verläuft gradlinig von der Bifurkation bis zum Eintritt in den rechten Unterlappen und setzt sich dann als Hauptbronchus des rechten Unterlappens bis in die spitz zulaufende Kante des Lappens fort. Von diesem Hauptbronchus entspringen Abgänge, die als Nebenbronchien erster Ordnung zu bezeichnen sind. Der rechte Oberlappenbronchus entspringt rechts lateral vom Hauptbronchus, der rechte Mittellappenbronchus etwas tiefer rechts medial, unmittelbar neben dem links medial abgehenden infracardialen Lappenbronchus. Die folgenden Abgänge versorgen den rechten Unterlappen. Innerhalb der einzelnen Lungenlappen stimmen die zentralen leitenden Luftwege im Verzweigungsmuster überein.

Der Hauptbronchus des linken Lungenlappens beginnt als linker Stammbronchus an der Bifurkation und setzt sich bis in die Kante des linken Lungenflügels fort. Er wird von einer ventralen, einer medialen und einer dorsalen Reihe von Nebenbronchien aufgebaut. Die ventrale Reihe wird von sechs bis sieben großen, ventral vom Hauptbronchus abgehenden Bronchien gebildet. Die dorsale Reihe besteht aus sechs

bis sieben dorsal abzweigenden kleineren Bronchien und die mediale Reihe aus fünf bis sechs kleineren Bronchien.

Im Gegensatz zu anderen Spezies dominieren im gesamten Atemwegsepithel der Lunge der Maus Clarazellen mit einem Anteil von 50-60 %. Becherzellen werden lediglich im Bereich der Bifurkation und des Stammbronchus vermehrt gefunden. Auch submuköse Drüsen sind in der Schleimhaut nur bis zur Aufzweigung der Atemwege in die einzelnen Lungenlappen zu finden. Die unteren Abschnitte sind drüsenfrei (Pack et al. 1981).

Knorpelspangen sind in der Trachea, den beiden Stammbronchien, dem Anfangsteil des ersten ventralen Nebenbronchus des linken Lungenflügels sowie im Ursprung des Lappenbronchus des rechten Oberlappens zu finden. Alle anderen großen luftleitenden Wege besitzen keine Knorpel Elemente in ihren Wänden (Valerius 1996).

Die Benennung der einzelnen Abschnitte erfolgt in der vorliegenden Arbeit aufgrund der histologischen Struktur der Wandung und ist strikt auf die menschliche Anatomie ausgerichtet (Staub 1963, Bargmann 1977, Duncker 1985, Forrest 1991). Bronchien sind durch eine knorpelige Aussteifung, durch ein Flimmerepithel mit Becherzellen und durch gemischt sero-muköse Drüsen gekennzeichnet. Auf die kleinen Bronchien folgen die Bronchiolen, deren Wände keine Knorpel Elemente und keine sero-mukösen Drüsen mehr besitzen und dessen Epithel von Clarazellen dominiert wird (Junqueira 1986).

2.2. Die neuronale Kontrolle der unteren Atemwege

Die unteren Atemwege, die distal des Kehlkopfes beginnen, werden von zahlreichen Nervenfasern mit unterschiedlichem Ursprung innerviert. Nach klassischer Einteilung unterscheidet man ein autonomes, efferentes System mit einem sympathischen und einem parasympathischen Anteil und ein sensibles System. Die verschiedenen Nervenfaserp Populationen vereinigen sich an der Hinterwand der Trachea zu einem Nerven Geflecht, welches am Lungenhilus in die Lunge eintritt.

Neben den klassischen Neurotransmittern Noradrenalin in postganglionären sympathischen und Acetylcholin (ACh) in parasympathischen Nervenfasern existieren in den autonomen und auch in den sensiblen Nervenfasern eine Reihe von Neuropeptiden, die ausgeprägte Effekte auf den Muskeltonus von Blutgefäßen und Bronchien sowie auf Drüsensekretion und Entzündungs- und Immunzellen haben

(Lundberg et al. 1988, Boichot et al. 1993, Iwamoto et al. 1993). Die Effekte, die diese Neuropeptide in den Atemwegen hervorrufen, werden unter dem Begriff des nicht-adrenergen, nicht-cholineren (NANC)-System zusammengefasst (Crimi & Mistretta 1989, Stretton 1991).

2.2.1. Parasympathische Innervation

Die präganglionär parasympathischen Neurone liegen im *Nucleus dorsalis nervi vagi* und im *Nucleus ambiguus*. Sie entsenden ihre Axone als einen Teil des *N. vagus* zu den Neuronen in den Atemwegen gelegenen Ganglien. Der *N. vagus* ist ein gemischter Nerv, der an der Innervation der meisten Eingeweide beteiligt ist. Nach dem Abgang des *N. laryngeus recurrens* führt der *N. vagus* parasympathische und viszerosensible Fasern. Die *Pars thoracica* des *N. vagus* tritt unter der *Arteria subclavia* hindurch ins *Spatium mediastini* ein. Auf der rechten Seite steigt er zur Trachea auf und zieht über diese und die Lungenwurzel hinweg zum Oesophagus. Auf der linken Seite verläuft er dorsolateral über den *Truncus brachiocephalicus* und den Aortenbogen zur *Bifurcatio tracheae*. An der Lungenwurzel entlässt der Vagusstamm die *Rami bronchiales*, die zusammen mit Zweigen des sympathischen *Ganglion cervicothoracicum* und Ästen der vorderen Brustganglien des Grenzstranges den dorsal und ventral von den Stammbronchen gelegenen *Plexus pulmonalis* bilden. Dort erfolgt die Umschaltung auf kurze postganglionäre Nervenfasern, die zu den verschiedenen Zielgebieten der unteren Atemwege ziehen (Nickel et al. 1987).

Der klassische Mediator der prä- und postganglionären parasympathischen Neurone ist ACh. Der Nachweis von ACh als Transmitter in postganglionären parasympathischen Neuronen konnte in Untersuchungen an verschiedenen Säugerspezies indirekt durch die Nachweise des ACh-Abbauenzym Acetylcholinesterase (AChE; Mann 1971), des ACh-synthetisierenden Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT; Canning & Fischer 1997) und des vesikulären ACh-Transporters (VAChT; Arvidsson et al. 1997) erfolgen.

Über die Lokalisation der cholinergen parasympathischen Nervenfasern und ihrer Mediatoren in der Lunge ist bekannt, dass die Nervenfasern in erster Linie die Haupteffektorzellen der Lunge, glatte Muskelzellen und exokrinen Drüsen der Atemwege innervieren (Wessler et al. 1998). Jedoch scheinen die glatten Muskelzellen der peripheren Atemwege nur einer geringen, möglicherweise sogar überhaupt keiner parasympathischen Kontrolle zu unterliegen. Elektrische

Stimulationen von Vagusnerven bei Katzen und Hunden verursachten keine Konstriktion der terminalen Bronchioli und Alveolen (Wessler & Kirkpatrick 2001). Ein reichhaltiges Netzwerk an AChE-positiven Nervenfasen konnte beim Menschen in der glatten Muskulatur der Bronchien bis zu den terminalen Bronchioli gefunden werden (Partanen et al. 1982), allerdings wurden auch hier distal der terminalen Bronchioli keine Nervenendigungen mehr nachgewiesen (Richardson 1977).

Im Bronchialepithel von Maus (Pack et al. 1981), Meerschweinchen (Canning & Fischer 1997) und Mensch (Wessler et al. 1998) lassen sich histochemisch keine cholinergen Nervenendigungen nachweisen.

Neben dem klassischen Mediator ACh wurden in parasympathischen Neuronen der Atemwege des Menschen weitere Mediatoren entdeckt, die unterschiedliche pharmakologische Wirkungen besitzen. Zu diesen zählen das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP; Dey et al. 1981) und das Stickstoffmonoxid (NO; de Rada et al. 1993). Bei anderen Spezies konnten noch weitere Mediatoren wie Galanin (Cheung et al. 1985), Substanz P (Dey et al. 1988, Fontan et al. 2000), das Calcitonin-Gen-abhängige-Peptid (calcitonin-gene-related peptide, CGRP; Nohr et al. 1995) und Opioide (Shimosegawa et al. 1990) nachgewiesen werden.

Die parasympathischen Neurone der Atemwege erhalten außerdem modifizierende Einflüsse von Neuronen unterschiedlicher Herkunft (Coburn & Tomita 1973), hier werden beim Meerschweinchen Axonkollaterale sensibler Nervenfasern (Kummer et al. 1992a) sowie sympathische Rezeptoren ($\alpha 2$ -Rezeptoren) in intrinsischen Ganglien bei Meerschweinchen und Mensch beschrieben (Andersson & Grundstrom 1987).

2.2.2. Sympathische Innervation

Die präganglionären Neurone des Sympathikus liegen im *Nucleus intermediolateralis* und im *Nucleus intercalatus* des thorakalen Rückenmarks. Ihre Axone verlassen gemeinsam mit den motorischen Fasern über die Vorderwurzeln das Rückenmark und ziehen zu den prä- und paravertebralen Ganglien. Als so genannter Grenzstrang, *Truncus sympathicus*, liegt er als paariger Strang im Brust-, Lenden-, Kreuz- und Sacralbereich ventrolateral den Wirbelkörpern an. Im Kopf- und Halsteil ziehen sympathische Nervenfasern vom dorsomedialen Rand der *A. carotis communis* bindegewebig mit dem Halsteil des *Nervus (N.) vagus* zum *Truncus vagosympathicus* verbunden kopfwärts. An die Stelle der kleinen segmentalen Grenzstrangganglien treten zwei größere Ganglien, das *Ganglion cervicale mediale* und das *Ganglion*

cervicale craniale (superius). Als weiteres Ganglion liegt am Brusteingang das *Ganglion cervicale caudale* lateral von der Trachea, das in der Regel mit dem *Ganglion thoracicum I*, meist auch mit den *Ganglia thoracica II* und *III* zu einem größeren, abgeplatteten Knoten verschmolzen ist. Dieses *Ganglion cervicothoracicum* wird wegen seiner sternförmig angeordneter Äste auch als *Ganglion stellatum* bezeichnet. Postganglionär sympathische Neurone ziehen vom *Ganglion cervicale craniale*, vom *Ganglion stellatum* und von den oberen thorakalen Grenzstrangganglien zu Trachea und Lunge (Nickel 1987).

Als Transmitter der präganglionären Neurone wurden neben ACh (Lindh et al. 1986) auch NO gefunden (Blottner & Baumgarten 1992).

Der klassische Neurotransmitter Noradrenalin (NA) der postganglionären sympathischen Nervenfasern gehört zu den Katecholaminen. Für dessen Synthese bedarf es der Aminosäure Tyrosin. Durch Methylierung von NA wird Adrenalin gebildet. Diese Katecholamine werden in den Zellen des Nebennierenmarks und des sympathischen Nervensystems in Sekretgranula bis zu ihrer Freisetzung gespeichert. Neben den Katecholaminen wurden weitere Mediatoren in postganglionären sympathischen Nervenfasern der unteren Atemwege beschrieben. Dazu gehört das Neuropeptid Y (NPY), das oft zusammen mit Katecholaminen in sympathischen Nervenfasern um die Arterien, Arteriolen und in der glatten Bronchialmuskulatur der unteren Atemwege angetroffen wird (Lundberg et al. 1983, Uddman et al. 1984). NPY kommt teilweise auch gemeinsam mit VIP (Kap. 2.2.1.) in sympathischen Nervenzellen der Atemwege vor (Bowden & Gibbins 1992).

Die sympathische Innervation der Atemwege weist erhebliche Speziesunterschiede auf. So konnte beim Meerschweinchen ein dichtes Geflecht von noradrenergen Nervenfasern gefunden werden (Coburn & Tomita 1973), während beim Menschen solche Anteile nur um Gefäße und submuköse Drüsen (Partanen et al. 1982, Pack & Richardson 1984) und spärlich in der glatten Atemwegsmuskulatur lokalisiert sind (Partanen et al. 1982, Pack & Richardson 1984, Laitinen 1985).

2.2.2.1. Wirkung von Noradrenalin auf die Atemwege

Noradrenerge sympathische Nervenfasern, die beim Menschen nur spärlich in der glatten Atemwegsmuskulatur lokalisiert sind (Partanen et al. 1982, Pack & Richardson 1984, Laitinen 1985), sind an der Atemwegsrelaxation beteiligt (Coburn & Tomita 1973). Durch Rezeptorbindungsstudien konnte eine hohe Dichte von β -Adrenozeptoren (β_2 häufiger als β_1) aber relativ wenig α -Rezeptoren im

Lungengewebe vieler Spezies, einschließlich des Menschen nachgewiesen werden (Barnes et al. 1980). Bei Stimulation der sympathischen Nerven wird NA freigesetzt. Beim Menschen vermittelt Noradrenalin (NA; vorwiegend über β_2 -Rezeptoren), durch Aktivierung der Adenylatzyklase, eine Bronchodilatation, Sekretionssteigerung sowie eine Steigerung der Zilienschlagfrequenz. Bei Katzen und Frettchen wird die Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur hauptsächlich über β_1 -Rezeptoren vermittelt (Lulich et al. 1976, Skoogh et al. 1989). Aber auch die Möglichkeit einer Konstriktion der tracheobronchialen glatten Muskulatur konnte unter bestimmten Bedingungen über eine Stimulation der α -Rezeptoren bei verschiedenen Spezies einschließlich des Menschen (Kneussl & Richardson 1978) nachgewiesen werden.

2.2.3. Sensible Innervation

Der größte Teil der sensiblen, afferenten Nervenfasern der Atemwege verläuft mit dem *N. vagus* und endet mit der zentralen Projektion im Kerngebiet des *Tractus solitarius*. Die Perikaryen dieser pseudounipolaren Neurone liegen in den vagalen sensiblen Ganglien (*Ganglion jugulare* und *Ganglion nodosum*; Kummer et al. 1992a). Auch eine zusätzliche afferente Versorgung der Atemwege aus den thorakalen Spinalganglien wurde nachgewiesen (Springall et al. 1987). Diese afferenten Nervenfasern verlaufen zusammen mit den sympathischen Axonen, durchqueren die sympathischen Grenzstrangganglien und münden über die Hinterwurzel ins Hinterhorn des Rückenmarks (Lundberg et al. 1988, Kummer et al. 1992a).

Die Erregungen erhalten die sensiblen Nervenfasern von Berührungs- und Dehnungsrezeptoren an der Trachea, den Bronchien und den Bronchioli.

Die sensiblen Nervenendigungen reichen beim Mensch bis in das bronchiale Oberflächenepithel (Wessler et al. 1998), während dort bei der Maus keine Nervenendigungen angetroffen werden (Pack et al. 1981). Solche Rezeptoren sind außerdem unter der Pleura lokalisiert. Sensible Nervenfasern können sowohl durch exogene (z. B. Capsaicin) als auch durch endogene (z. B. Histamin, Bradykinin, Prostaglandine) Stimuli aktiviert werden (Saria et al. 1988).

Die Nervenfasern lassen sich aufgrund elektrophysiologischer Eigenschaften einteilen: Man unterscheidet langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren (slowly adapting stretch receptors; SAR), die hauptsächlich in der glatten Muskulatur der Trachea und der Bronchien vorkommen und durch myelinisierte Axone relativ hohe Leitungsgeschwindigkeiten erreichen. Ferner existieren schnell adaptierende

Dehnungsrezeptoren (rapidly adapting stretch receptors; RAR), die sich sowohl im respiratorischem Epithel als auch in der glatten Atemwegsmuskulatur befinden. Auch sie besitzen im Gegensatz zu den C-Fasern myelinisierte Axone (Coleridge & Coleridge 1984). Die C-Fasern, die aufgrund ihrer unmyelinisierter Axone nur sehr langsam leiten, sind in der Trachea, den Bronchien und im Lungenparenchym anzutreffen.

Nach Stimulation sensibler Neurone werden an der Synapse im zentralen Nervensystem erregende Transmitter wie Glutamat bzw. Aspartat freigesetzt (Dalsgaard & Lundberg 1984). Sensible Nervenendigungen können nach adäquater Reizung auch Mediatoren in der Lunge freisetzen (Neuroeffektorfunktion sensibler Nervenfasern; Levine et al. 1985, Stretton 1991). Zu diesen, in den Atemwegen vorkommenden Mediatoren zählt NO und die Familie der Tachykinine, zu denen die Neuropeptide Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) gehören. Ein weiteres wichtiges Neuropeptid der sensiblen Nervenfasern ist CGRP (Kummer et al. 1992b, Verastegui et al. 1997). Die Tachykinine wurden mit immunhistochemischen Methoden in den Nervenfasern der unteren Atemwege des Meerschweinchens und des Menschen nachgewiesen (Lundberg et al. 1984, Hua et al. 1985, Kummer et al. 1992b).

2.2.4. Nicht-adrenerges, nicht-cholinerges-System

Unter dem Begriff des nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC)-Systems fasst man eine Reihe von Neuropeptiden zusammen, die ausgeprägte pharmakologische Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße und der Bronchien sowie auf die Drüsensekretion und auf Entzündungs- und Immunzellen haben (Lundberg et al. 1988, Boichot et al. 1993, Iwamoto et al. 1993).

Aufgrund physiologischer und pharmakologischer Erkenntnisse können die NANC-Mediatoren in zwei funktionelle Gruppen eingeordnet werden (Widdicombe 1998). Zum exzitatorischen NANC-System (e-NANC) gehören die Tachykinine und CGRP (Lundberg et al. 1983, Karlsson et al. 1984). NO, VIP und NPY gehören zum inhibitorischen NANC-System (i-NANC; Lundberg et al. 1984, Li & Rand 1991).

Die Tachykinine (SP, NKA, NPY), die v. a. in den Nervenfasern der unteren Atemwege des Meerschweinchens und des Menschen nachgewiesen wurden (Hua et al. 1985, Lundberg et al. 1984), vermitteln ihre Wirkung über Tachykinin-Rezeptoren (NK1 und NK2; Helke et al. 1990). Sie wurden besonders in der Tracheal- und

Bronchialmuskulatur, Drüsen- und respiratorischen Epithel sowie in einzelnen Zellen der *Lamina propria* nachgewiesen (Fischer et al. 1992). Durch die unterschiedliche Affinität der Tachykinine zu ihren Rezeptoren lassen sich diese pharmakologisch differenzieren. Insgesamt können die Wirkungen in den Atemwegen als proinflammatorisch bezeichnet werden (Joos et al. 2000).

NO wird von drei unterschiedlichen Isoformen des Enzyms NO-Synthetase (NOS) bei der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin produziert (Moncada et al. 1989). Im Gegensatz zu den meisten Neuromediatoren wird NO bei Bedarf erst synthetisiert. In die Effektorzelle freigesetztes NO aktiviert direkt die lösliche Form der Guanylatzyklase (GC) und führt so beispielsweise in glatten Muskelzellen zu einer Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat- (cGMP-) Spiegels (Rapoport et al. 1983, Ignarro 1992, Rand 1992). Verschiedene Studien zeigten eine NO-induzierte cGMP-abhängige Relaxation der menschlichen glatten Trachealmuskulatur (Janssen et al. 2000, Tallet et al. 2002). Neben den erwähnten Wirkungen verursacht NO als radikales Molekül auch schädigende Effekte. Aus NO können Stickstoffoxide wie Nitrit und Nitrat entstehen. NO kann aber auch mit Peroxiden zu Peroxynitrit reagieren (Beckman et al. 1990, Huie & Padmaja 1993). Die verschiedenen Stickstoffoxide sind sehr reaktionsfreudig und reagieren mit Sauerstoff, Sauerstoffperoxiden, Wasser, Proteinen, Aminen, Nukleotiden und Lipiden. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte führen ebenfalls zur Bronchodilatation, Erhöhung der pulmonalen Gefäßpermeabilität (Peroxynitrit) oder haben mutagenes Potential (Nitrosamin; Beckman et al. 1990).

Die NANC-Mediatoren erlangten in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung, da sie möglicherweise an der Pathogenese des *Asthma bronchiale* beteiligt sind.

2.3. Acetylcholin

2.3.1. Synthese von Acetylcholin

2.3.1.1. Neuronales Acetylcholin

Die Wirkung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) wurde erstmals von Dale beschrieben (Dale 1935), der Nachweis seiner neuronalen Freisetzung erfolgte durch Loewi (Loewi 1921).

ACh ist Überträgersubstanz der präganglionären sympathischen sowie der prä- und postganglionären parasympathischen Neurone. Ferner ist ACh Transmitter der Motoneurone und Mediator im ZNS. Die Synthese des ACh erfolgt im Zytoplasma der Nervenendigung aus Cholin und Acetyl-Coenzym A durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT). Nach seiner Bildung wird es in Speichervesikel innerhalb der Neurone über einen vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) aufgenommen. Die Stimulation der Neurone hat eine kurzfristige Änderung des Membranpotentials zur Folge, welches - nachdem es einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat (Aktionspotential) - zu einer Transmitterfreisetzung aus der Nervenendigung führt. Beim Eintreffen eines Aktionspotentials kommt es in erster Linie durch den Einstrom von Natrium durch spannungsabhängige Natriumkanäle gefolgt von einem Kaliumausstrom, entsprechend des chemischen Gradienten, zu einer Ladungsumkehr der Oberfläche der Zellmembran. In der Zellmembran der Nervenendigung werden durch das Aktionspotential spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, die einen Einstrom von Kalzium zur Folge haben. Das einströmende Kalzium verknüpft die elektrische Erregung der Membran mit der Exozytose der Speichervesikel. Das freigesetzte ACh wirkt über nikotinische (nAChR) und muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) auf der prä- und postsynaptischen Membran nachgeschalteter Zellen (andere Neurone oder Effektorzellen). Nach der Freisetzung muss ACh wieder inaktiviert werden, was die Cholinesterasen leisten. Das bei dessen Spaltung entstehende Cholin kann wieder über den hochaffinen Cholintransporter in die Nervenendigung aufgenommen werden (Starke 1996).

2.3.1.2. Nicht-neuronales Acetylcholin

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch viele nicht-neuronale Zellen das Enzym ChAT besitzen (Klapproth et al. 1997) und zur ACh-Synthese befähigt sind. Damit stellt das Enzym ChAT keinen spezifischen Marker für cholinerge Nervenzellen dar (Wessler & Kirkpatrick 2001). Nach der Synthese von ACh in nicht-neuronalen Zellen dient das Molekül als auto- oder parakriner Mediator, d. h. er wirkt auf die Zelle seiner Synthese oder dessen Nachbarzellen. Die Existenz von nicht-neuronaalem ACh erklärt das weit verbreitete Vorkommen nAChR und mAChR in Zellen, die nicht von cholinergen Neuronen innerviert werden (Wessler et al. 1998).

Wie nicht-neuronalen Zellen ACh speichern und freisetzen, ist bisher nicht geklärt. Die Freisetzung könnte über Mediatophore erfolgen (Wessler et al. 1998). Zudem sind

organische Kationentransporter (OCTs) in der Lage ACh aus der Zelle zu transportieren (Wessler et al. 2001). Auch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) wird von einer Reihe nicht-neuronaler, ACh-synthetisierender Zellen gebildet und stellt keinen ausschließlichen Marker für cholinerge Nervenzellen dar (Rorstad & Huang 1993). Im Organismus gibt es neben der AChE, die weitverbreitete Butyrylcholinesterase, die ebenfalls ACh abbaut und eine unspezifische Reaktion von nicht-neuronal freigesetztem ACh verhindern. Der Effekt des nicht-neuronalen ACh ist daher auf den Bereich seiner Synthese und Freisetzung beschränkt (Wessler et al. 1998).

2.3.2. Rezeptoren für Acetylcholin

Die Acetylcholinrezeptoren (AChR) sind als Proteorezeptoren aus Aminosäuren aufgebaut. Man unterscheidet nach ihrer Affinität zum Agonisten prinzipiell zwei Arten von AChR: nikotinische (nach dem Alkaloid der Tabakpflanze) und muskarinische (nach einem Alkaloid des Fliegenpilzes) AChR.

2.3.2.1. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Bei den nAChR handelt es sich um Liganden gesteuerte Kationenkanäle, die in der Zellmembran verschiedener Zellen vorkommen. Sie sind die klassischen Rezeptoren des ZNS, der neuromuskulären Endplatte und der präganglionären cholinergen Neurone. Der Rezeptor ist gleichzeitig der Ionenkanal. Er besteht aus fünf Untereinheiten, die ringförmig eine Pore umgeben, die in Ruhe geschlossen ist. Die Ligandenbindung führt innerhalb von Millisekunden zum Öffnen der Pore und dem Einstrom von Natrium- und Kalziumionen, sowie dem Ausstrom von Kaliumionen (Starke 1996).

2.3.2.2. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

In Plasmamembranen von Neuronen und nicht-neuronalen Zellen wie beispielsweise Drüsen, glatten und Herzmuskelzellen sind mAChR lokalisiert. Die Wirkung der Rezeptoren wird über eine intrazelluläre, G-Protein-gekoppelte Signalkaskade vermittelt (Kap. 2.4).

Auf genetischer Ebene sind fünf Subtypen (mAChR1 bis mAChR5) unterscheidbar. Alle Mitglieder der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind mit sieben Transmembran-Helices in der Plasmamembran verankert. Das aminoterminal Ende

des Proteins befindet sich auf der extrazellulären Seite, das carboxyterminale-Ende dagegen intrazellulär. Die Aminosäuresequenz der fünf mAChR-Subtypen stimmt zu 90 % überein. Unterschiede sind im zytoplasmatischen Anteil und den extrazellulären Abschnitten zu finden. Der zytoplasmatische Anteil des Proteins ist für die Bindung des G-Proteins verantwortlich (Felder 1995).

2.3.3. Acetylcholin in der Lunge

2.3.3.1. Quellen für Acetylcholin in der Lunge

Von parasymphathischen Nerven freigesetztes, neuronales ACh spielt in den zentralen Atemwegen eine vorherrschende Rolle. Die Nerven innervieren die glatte Bronchialmuskulatur, und ACh dient dort als Transmitter (Wessler & Kirkpatrick 2001). Aber auch glatte Muskelzellen der Atemwege des Menschen besitzen durch das Enzym AChE eigens die Fähigkeit zur ACh-Synthese (Wessler & Kirkpatrick 2001). Bronchialepithelzellen von Mensch (Klapproth et al. 1997, Wessler et al. 1999), Ratte (Klapproth et al. 1997, Pfeil et al. 2003) und Meerschweinchen (Canning & Fischer 1997) weisen das Enzym ChAT, den hochaffinen Cholintransporter oder ACh auf. Damit stellt auch das Bronchialepithel eine Quelle von nicht-neuronalem ACh dar (Reinheimer et al. 1996, Klapproth et al. 1997, Pfeil et al. 2003).

Beim Meerschweinchen konnte ChAT auch in pulmonalen Endothelzellen nachgewiesen werden (Haberberger et al. 1997), womit auch diese Zellen zur ACh-Synthese befähigt erscheinen. Auch Immunzellen sind in der Lage, den Botenstoff zu generieren. Da diese in der Lunge in starkem Maße vorkommen, kann auch von einer ACh-Synthese durch diese Zellen ausgegangen werden.

2.3.3.2. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren in der Lunge

Die Subtypen mAChR1, mAChR2 und mAChR3 wurden in den Atemwegen von Mensch, Ratte, Maus und Schwein nachgewiesen (Fryer & el-Fakahany 1990, Mak et al. 1992, Garssen et al. 1993, Hislop et al. 1998). Auf den glatten Muskelzellen von Trachea und Stammbronchien ist zuerst der mAChR3 nachgewiesen worden (Roffel et al. 1990, Halayko et al. 1999, Stengel et al. 2000, Stengel et al. 2002). Die glatten Muskelzellen exprimieren neben dem Subtyp mAChR3 aber auch den mAChR2 (Zaagsma et al. 1997, Fryer & Jacoby 1998, Barnes 2001). In den Atemwegen vieler Spezies inklusive des Menschen wurde mAChR2 auch in parasymphathischen

Nervenendigungen, welche die glatte Muskulatur innervieren, gefunden. Neben den Subtypen mAChR2 und mAChR3 wird mAChR1 in der Lunge exprimiert (Barnes 1993, Reinheimer et al. 2000). Der Rezeptor findet sich auf respiratorischen Epithelzellen, den Endigungen sympathischer Nerven und auf glatten Bronchialmuskelzellen (MacLagan et al. 1989, Shapiro et al. 1999). Beim Menschen wurde er auch in parasympathischen Ganglien nachgewiesen (MacLagan et al. 1989). Bei der Ratte zeigt sich, dass die Verteilung der einzelnen Subtypen innerhalb der Lunge variiert. So konnte der mAChR1 mit Hilfe selektiver Antagonisten in den zentralen Atemwegen nicht, wohl aber in den peripheren Atemwegen gefunden werden (Fryer & el-Fakahany 1990). In den zentralen Atemwegen wurde neben dem Subtyp mAChR2 v. a. der mAChR3 angetroffen (Fryer & el-Fakahany 1990).

2.3.3.3. Wirkung von Acetylcholin auf die Atemwege

Das von den parasympathischen Nervenfasern freigesetzte ACh stellt den dominanten neuronalen Bronchokonstriktor v. a. der oberen Atemwege dar. Durch Bindung an den mAChR3 vermittelt ACh auf glatten Bronchialmuskelzellen eine Konstriktion (Wessler & Kirkpatrick 2001). Die Aktivierung des ebenfalls auf Bronchialmuskelzellen vorkommenden mAChR2 ist durch eine Hemmung der cAMP-Synthese mit einer folgenden Blockade der β 2-Effekte gekennzeichnet. Über die mAChR2-Aktivierung kommt es außerdem zur Stimulation eines unspezifischen Kationeneinstroms, sowie zur Sensibilisierung kontraktile Proteine durch Tyrosinkinasen (Matsui et al. 2002). Vermutlich ist das gemeinsame Agieren von mAChR2 und mAChR3 ein generelles Phänomen bei der Regulation des Konstriktionszustandes der glatten Muskulatur (Matsui et al. 2002). Der mAChR2 auf parasympathischen Nervenendigungen, die an der Innervation der glatten Muskelzellen beteiligt sind, scheint als inhibitorischer Autorezeptor die weitere ACh-Freisetzung und damit die Konstriktion zu verhindern (MacLagan & Barnes 1989). Geht diese inhibitorische Kontrolle des mAChR2 verloren wie es vermutlich beim *Asthma bronchiale* der Fall ist (Zaagsma et al. 1997), kommt es zur Vagus-vermittelten Bronchokonstriktion und Hyperreaktivität der Bronchien (Fryer & Jacoby 1998).

Den peripheren Atemwegen fehlt, wie bei Hund und Katze nachgewiesen wurde, vermutlich die neuronale Kontrolle (Wessler & Kirkpatrick 2001). Daher könnte dort in erster Linie nicht-neuronales ACh die Konstriktion vermitteln. Im Vergleich zu den großen Bronchien zeigen die peripheren Atemwege bei der Ratte eine verstärkte Konstriktion auf mAChR-Stimulation durch Metacholin (Martin et al. 1996).

Die Aktivierung des mAChR1 auf parasympathischen Ganglien erleichtert die Weiterleitung von Nervenimpulsen zu den parasympathisch innervierten Strukturen wie mukösen Drüsen und glatter Muskulatur. Dadurch werden die parasympathischen Effekte wie Drüsensekretion und glattemuskuläre Konstriktion unterstützt (Campbell 2000).

Der Nachweis des mAChR1 auf sympathischen Nerven lässt darauf schließen, dass die bronchokonstriktischen Stimuli durch ACh indirekt einen gegenteiligen sympathischen Reflex auslösen. Daher zeigt sich beim Einsatz eines spezifischen mAChR1-Antagonisten, wie dem Pirenzepin eine verstärkte Vagus-induzierte Bronchokonstriktion (MacLagan et al. 1989).

Der mAChR1 auf Epithelzellen ist vermutlich für die Freisetzung bronchodilatativer Substanzen wie z. B. NO und PGE₂ verantwortlich (Spicuzza et al. 2002, Tilley et al. 2003). Fehlt das Atemwegsepithel, so führten spasmogene Stimuli zu einer verstärkten Konstriktion der glatten Muskulatur der Rindertrachea (Spicuzza et al. 2002).

2.4. Signalwege muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren sind an Guaninnucleotid bindende Regulatorproteine (G-Proteine) gekoppelt, wobei man die Pertussis-Toxin insensitive (G_{q/11}-Proteine) und Pertussis-Toxin sensitive (G_{i/o}-Proteine) unterscheidet. Die Rezeptoren der Subtypen mAChR1, mAChR3 und mAChR5 wirken bevorzugt über G_{q/11}-Proteine, während die Wirkung von mAChR2 und mAChR4 vornehmlich G_{i/o}-Protein-vermittelt ist (Caulfield 1993, Felder 1995).

Das ruhende G-Protein ist ein Heterotrimer aus einer α -, β -, und γ -Untereinheit. An die α -Untereinheit ist Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Hat der Rezeptor mit einem Agonisten reagiert, dann aktiviert er das zugehörige G-Protein indem das GDP an der α -Untereinheit gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Das α -GTP dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Komplex und beeinflusst nachfolgende Enzymsysteme (Kap. 2.4.1). Die Inaktivierung erfolgt, indem GTP zu GDP hydrolysiert wird. Dabei wirkt die α -Untereinheit als GTP-ase, und α -GDP wird mit dem $\beta\gamma$ -Komplex reassoziert (Caulfield 1993).

Gemäß ihrer funktionellen Kopplung der G-Proteine an ein Effektorsystem können die mAChR in zwei Gruppen unterteilt werden: Die Stimulation der Subtypen mAChR1,

mAChR3, mAChR5 vermittelt über eine Aktivierung der Phospholipase A₂, C, D oder der Tyrosin-Kinase eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels. Über eine Hemmung der Adenylatzyklase bewirken mAChR2 und mAChR4 ein Absinken des cAMP-Spiegels in der Zelle bzw. modulieren Kaliumkanäle (Felder 1995).

2.4.1. Funktionale Kopplung von G-Proteinen

Nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung der G-Proteine sind verschiedene intrazelluläre Enzymkaskaden beteiligt:

2.4.1.1 Phospholipase C

Die β -Isoform der Phospholipase C (PLC), die v. a. durch mAChR1, mAChR3 oder mAChR5 (und weniger durch mAChR2 oder mAChR4) aktiviert wird (Lambert et al. 1992, Felder 1995), katalysiert im Phosphoinositol-Lipid-Zyklus die Bildung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). Neben IP₃ kann auch Inositol-1,3,4,5-Tetra (IP₄)-, 1,3,4,5,6-Penta (IP₅)- und 1,2,3,4,5,6-Hexaphosphat (IP₆) entstehen, deren Funktionen bisher unklar sind (Caulfield 1993).

Das in der Membran gebildete IP₃ wirkt über spezifische IP₃-Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und vermittelt dort eine Kalziumfreisetzung (Abb. 1). Durch die Kalziumerhöhung wird die Konstriktion der glatten Muskulatur vermittelt (Kap. 2.4.3.). Über die Aktivierung einer Proteinkinase C (PKC) durch DAG (und intrazellulär frei verfügbares Kalzium), kann das G-Protein und damit die PLC-Aktivierung im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus inhibiert werden (Caulfield 1993). Die PKC kann aber auch über die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (MLC₂₀) zur Konstriktion der glatten Muskelzellen führen (Abdel-Latif 2001). Es wird von einer Reihe weiterer biochemischer Effekte im Zusammenhang mit dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und IP₃ berichtet. Dazu zählen die Aktivierung der Phospholipase A₂ mit der Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran sowie ein Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Guanosinmonophosphat (cGMP), welche als second messenger in weitere Signalwege integriert sind (Hulme et al. 1990, Jones 1992).

2.4.1.2. Adenylatzyklase

Die Adenylatzyklase (AC) synthetisiert aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches als second messenger fungiert. Nach Stimulation von mAChR2 und mAChR4 ist eine Hemmung der AC beschrieben worden (Buckley et al. 1990; Abb. 1).

Durch mAChR3 Stimulation ist ein Anstieg von cAMP an menschlichen Neuroblasten (Baumgold & Fishman 1988), der *Glandula olfactoria* der Ratte (Olianas & Onali 1992), sowie an Parotiszellen der Maus (Watson et al. 1990) und sympathischen Neuronen der Maus (Suidan et al. 1991) nachgewiesen worden. Auch in den peripheren Atemwegen der Ratte konnte ein Anstieg von cAMP nach Stimulation mit einem muskarinischen Agonisten gemessen werden. Dieser Anstieg ist an Arachidonsäure-Metaboliten gekoppelt und damit über den mAChR3 und die Aktivierung der PLC vermittelt. Die Vermittlung über mAChR3-Stimulation erscheint erstaunlich, da in den peripheren Atemwegen der Ratte der mAChR2 die Hauptrolle spielt (Esqueda et al. 1996).

2.4.1.3. Phospholipase A₂

Die Phospholipase A₂ (PLA₂) katalysiert die Hydrolyse der in der Zellmembran vorkommenden Phospholipide. Dabei entsteht Arachidonsäure und das korrespondierende Lysophospholipid. Die Arachidonsäure wird in bioaktive Eicosanoide z. B. Prostaglandine, Thromboxane oder Leukotriene umgewandelt, während die Lysophospholipide als wirksame Detergentien wieder von der Membran aufgenommen werden.

Die Synthese der Arachidonsäure und deren Eicosanoid-Metaboliten wurde in zahlreichen Studien z. B. an Herz, Gehirn und Muskel nachgewiesen (Abdel-Latif 1986). Es gibt Hinweise, dass die Aktivierung der PLA₂ über mAChR1, mAChR3 oder mAChR5 Rezeptoren erfolgt (Conklin et al. 1988, Felder et al. 1990, Liao et al. 1990) und nicht über mAChR2 oder mAChR4 (Conklin et al. 1988). Eine gesteigerte Synthese von Arachidonsäure und die daraus resultierende Synthese der Zyklooxygenase- und Lipoxygenaseprodukte scheint in vielen Geweben an den PIP₂-Zerfall gekoppelt zu sein (Abdel-Latif 1986). Aber auch die direkte Rezeptor-Kopplung an ein spezifisches G-Protein könnte eine Rolle bei der Kontrolle der PLA₂ spielen. Viele zelluläre Faktoren sind in der Lage, die Aktivität dieses Enzyms zu beeinflussen. So zeigen Studien zur Muskarin vermittelten Regulation der PLA₂, dass deren

Aktivierung z. B. durch einen Kalziumeinstrom und die intrazellulären Botenstoffe DAG sowie PKC erfolgen kann (Brooks et al. 1989, Felder et al. 1990). An isolierten Trachealmuskelpräparationen von Ratte (Chand et al. 1988) und Rind (Takata et al. 1999) ist durch niedrige PLA₂-Konzentrationen eine gesteigerte Konstriktion auf muskarinische Agonisten bzw. ACh beschrieben. Diese gesteigerte Konstriktion wird von einer erhöhten intrazellulären Kalziummobilisation begleitet, die auf die Synthese von Thromboxan A₂ zurückzuführen sein könnte (Takata et al. 1999). Durch hohe PLA₂-Konzentrationen konnte auch eine direkte Konstriktion verbunden mit einer intrazellulären Kalziumerhöhung nachgewiesen werden, die ebenfalls auf die Synthese von Thromboxan A₂ und andere Arachidonsäure-Metabolite (z. B. Prostaglandine) zurückgeführt wird (Takata et al. 1999).

Bei der Synthese von Thromboxan A₂, die zu einer gesteigerten Konstriktion im Bronchialmuskel führt, ist eine Abhängigkeit vom Metabolismus der Epithelzellen beschrieben (Strek et al. 1992). Da bei den Trachealmuskelpräparationen das Epithel fehlte, bleibt die Quelle für die zur Synthese von Thromboxan A₂ notwendigen Arachidonsäure unklar.

2.4.1.4. Phospholipase D

Phospholipase D (PLD) katalysiert die Hydrolyse der Membran-Phospholipide zu Phosphorsäure und deren freien Polargruppe. Sie katalysiert auch die Übertragung von Phosphatgruppen auf kurzkettige Alkohole, die dafür ihre polare Gruppe verlieren (Felder 1995). Diese Transphosphatidyl-Reaktion wird als Index der PLD-Aktivierung angesehen (Alling et al. 1984). Die Stimulation der PLD über muskarinische Rezeptoren wurde in zahlreichen Zelltypen wie Astrozyten der Ratte (Martinson et al. 1990), menschlichen Neuroblasten (Sandmann & Wurtman 1991) und Parotidezellen der Ratte (Guillemain & Rossignol 1992) nachgewiesen.

Ähnlich wie bei der PLC koppeln bevorzugt mAChR1 und mAChR3 und weniger mAChR2 und mAChR4 an die PLD. Die gemeinsame Aktivierung mit der PLC wird in vielen Studien nach Rezeptorstimulation beschrieben, die enzymatische Reaktion scheint aber unabhängig voneinander zu sein (Liscovitch 1991). Für ihre volle Aktivität scheint die PLD aber in einigen Zellen auf den Diaminoglycerol- und Kalziumspiegel nach PLC-Aktivierung angewiesen zu sein. Die direkte Kopplung eines mAChR über ein spezifisches G-Protein an PLD ist bisher nicht nachgewiesen worden. Die Beteiligung des G-Proteins gilt jedoch als bewiesen (Liscovitch 1991, Kanoh et al. 1992).

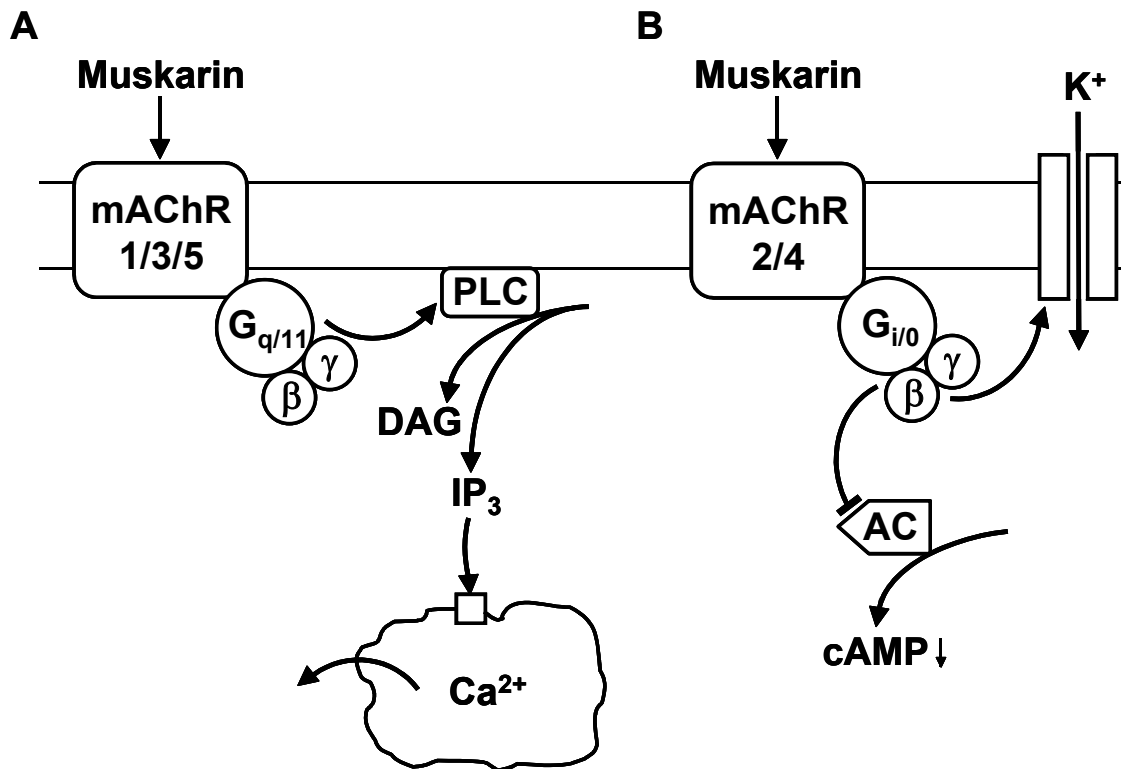


Abb. 1: Intrazelluläre Signalwege nach Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR). A: der Signalweg über den Phosphoinositolzyklus nach Stimulation der Subtypen mAChR1, mAChR3 und mAChR5; B: der Signalweg über eine Hemmung der Adenylatcyclase (AC) nach Stimulation der Subtypen mAChR2 und mAChR4

2.4.2. Kalziumfreisetzung

Über die Aktivierung der PLC kommt es zur Bildung von IP₃ und DAG aus PIP₂, und es folgt ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Der Konzentrationsanstieg des Kalziums wird in vielen zellulären Systemen wie in der glatten Muskulatur durch einen anfänglichen sprunghaften Anstieg (Peak) mit folgender Plateauphase, die die gesamte Dauer der Rezeptorstimulation anhält, charakterisiert. Der initiale, schnelle und starke intrazelluläre Kalziumanstieg wird der IP₃-sensitiven Freisetzung aus den Kalziumspeichern, vornehmlich dem ER, in der Zelle zugeschrieben (Berridge 1993). Die Plateauphase, die die Kalziumkonzentration aufrecht erhält, wird vermutlich über einen Kalziumeinstrom aus dem

Extrazellularraum hervorgerufen. Als Ursache für den Kalziumeinstrom wird ein Wiederauffüllen intrazellulärer Speicher diskutiert, um eine Antwort auf den vorhandenen Agonisten aufrecht zu erhalten (Fasolato et al. 1994, Parekh & Penner 1997). Durch einen Anstieg von cAMP und cGMP kommt es zum Absinken der intrazellulären Kalziumkonzentration. Verschiedene Mechanismen wie z. B. die Hemmung der IP₃-Bildung, die Blockade der Kalziumfreisetzung aus dem ER und ein erhöhter Abtransport oder eine Hemmung des Kalziumeinstroms durch die Zellmembran werden als Ursache für die sinkende Kalziumkonzentration diskutiert. Auch die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), die die PLC- β durch Phosphorylierung inaktiviert, ist beschrieben worden (Abdel-Latif 2001).

2.4.3. Die Konstriktion im glatten Muskel

Wie im Skelett- und Herzmuskel wird auch im glatten Muskel die Konstriktion durch eine Erhöhung der intrazellulären freien Kalziumkonzentration ausgelöst. Dabei ist die Höhe der Kalziumkonzentration grundsätzlich bestimmend für den Muskeltonus. Ein kontraktiles Element des glatten Muskels ist das dünne Aktinfilament, das aus dem globulären Aktinprotein, welches zweisträngig umeinander gewundene Ketten bildet, und dem zylinderförmigen Tropomyosin, besteht. Das dicke Filament besteht hauptsächlich aus Myosin, einem langgestreckten Molekül, an dessen Ende jeweils ein „Kopf“ sitzt. Ein Myosinmolekül besteht aus zwei identischen schweren Ketten, die aus einem helikalen Teil und einem globulären „Kopf“ bestehen, und zwei Paar leichten Ketten unterschiedlichen Typs, die an jeweils einen Myosinkopf gebunden sind. Die Myosinmoleküle sind zu Bündeln zusammengelagert und bilden das Myosinfilament (Hirche 1994). Calmodulin (CaM), ein zytoplasmatisches Protein, bindet vier Kalziumionen, wodurch eine Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII) aktiviert wird, die wiederum die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (Myosin-light-chain-kinasell; MLCKII) aktiviert, die die Myosinköpfe der leichten Ketten (MLC₂₀) phosphoryliert. Diese können dadurch an das Aktin binden, die Aktin- und Myosinfilamente gleiten aneinander vorbei (Filamentgleitmechanismus), und es kommt zur Konstriktion. Wenn der intrazelluläre Kalziumspiegel absinkt und der Kalzium-CaM-Komplex nicht mehr gebildet wird, werden die leichten Ketten der Myosinköpfe durch eine Phosphatase dephosphoryliert, Myosin kann nicht mehr an Aktin binden und der glatte Muskel erschlafft (Abdel-Latif 2001). Bei der Relaxation spielen neben der Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration die beiden zyklischen

Nukleotide Guanosinmonophosphat (cGMP) und Adenosinmonophosphat (cAMP) eine wichtige Rolle. Sie vermindern die Konstriktion über eine Hemmung der MLCKII, bzw. ebenfalls über eine Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Außerdem scheint die durch DAG (und Kalzium) aktivierte PKC über eine Phosphorylierung der MLC_{20} zur Konstriktion der glatten Muskelzellen zu führen (Abdel-Latif 2001). Außerdem wird diskutiert, dass die PKC eine gesteigerte Kalziumsensibilität in glatten Muskelzellen hervorruft, wie dies in Kolon (Sato et al. 1994), Blutgefäßen (Itoh et al. 1994) und Trachea (Park & Rasmussen 1985, Takuwa et al. 1987) beschrieben ist. Dieser Sensibilisierung wird die anhaltende Plateauphase bei der Konstriktion glatter Muskelzellen zugrunde gelegt. Die PKC-abhängige, anhaltende Konstriktion glatter Muskelzellen der Atemwege während der mAChR-Stimulation ist auch in anderen Arbeiten beschrieben, der genaue Mechanismus der hierfür verantwortlich ist, ist jedoch unklar (Gerthoffer 1991, Rossetti et al. 1995). Vermutet wird, dass über eine Hemmung von Phosphatasen durch PKC eine beschleunigte Bildung der Aktin-Myosin-Komplexe entsteht (Peiper et al. 1996). Die PKC vermittelte Sensitivität der glatten Muskelzellen wird jedoch kontrovers diskutiert, und es gibt Studien, die einen Einfluss der PKC an diesem Mechanismus für glatte Muskelzellen der Atemwege ausschließen (Bremerich et al. 1997, Bazan-Perkins et al. 1998).

2.4.4. Signalwege muskarinischer Rezeptoren in den Atemwegen

Vermutlich ist die Muskarin-vermittelte Konstriktion der glatten Muskulatur in erster Linie auf eine Aktivierung der PLC zurückzuführen. Durch deren Aktivierung kommt es zum IP_3 -abhängigen, intrazellulären Kalziumanstieg (Roux et al. 1998), der die nachfolgenden Konstriktion der glatten Muskulatur der Atemwege vermittelt. Die IP_3 -Synthese ist in glatten Muskelzellen der Trachea des Meerschweinchens nach Stimulation mit dem ACh-Agonisten, Metacholin, beschrieben worden (Meurs et al. 1988).

Dieser Signalweg steht mit der Aktivierung des mAChR3 in Verbindung, der ebenfalls auf den glatten Muskelzellen von Trachea und Bronchien nachgewiesen wurde (Roffel et al. 1990, Halayko et al. 1999, Stengel et al. 2000, Stengel et al. 2002).

Nach mAChR-Stimulation ist neben dem Anstieg von IP_3 auch eine Hemmung der AC in glatten Muskelzellen der Trachea des Meerschweinchens beschrieben worden (Pyne et al. 1992). Dieser Signalweg ist mit der Aktivierung von mAChR2 erklärbar,

die ebenfalls auf den glatten Muskelzellen von Trachea und Bronchien exprimiert werden (Zaagsma et al. 1997, Fryer & Jacoby 1998, Barnes 2001).

2.5. Kalziumkanäle in der Zellmembran

Für den Einstrom von Kalzium durch die Zellmembran stehen verschiedene Kanäle zur Verfügung: In exzitatorischen Zellen (z. B. Neuronen oder Muskelzellen) spielen die spannungsabhängigen Kanäle (voltage-operated calcium channel; VOCC) die Hauptrolle, welche sich nach Depolarisation der Membran öffnen. In nicht-exzitatorischen Zellen erfolgt der Kalziumeinstrom auch über eine Reihe spannungsunabhängiger Kanäle (voltage-insensitive calcium channel; VICC). Es gibt Hinweise, die auf ein Zusammenspiel von mAChR1, mAChR3 und mAChR5 mit allen bekannten VICCs deuten (Felder 1995).

Nach der Art ihrer Aktivierung werden die VICCs in drei Gruppen eingeteilt (Fasolato et al. 1994, Felder et al. 1994):

Die Rezeptor-abhängigen Kalziumkanäle (receptor-operated calcium channels; ROCCs) werden über die Bindung eines Mediators an einen Rezeptor in der Zellmembran aktiviert. Untersuchungen am mAChR3 haben gezeigt, dass ihre Aktivierung unabhängig von Kalzium, anderen second-messengern und der für die Bindung des G-Proteins verantwortlichen Domäne ist (Felder et al. 1991).

Der Einstrom über second-messenger-abhängige Kalziumkanäle (second-messenger-operated calcium channels; SMOCCs) wird über intrazelluläres Kalzium, IP_3 und möglicherweise auch IP_4 (Irvine 1992) reguliert (Felder 1995).

Der Einstrom über speicherabhängige Kalziumkanäle (store-operated calcium channels; SOCCs) wird über die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher stimuliert (Felder 1995). Der erste charakterisierte Kanal dieser Art wurde als Calcium-release-activated calcium current bezeichnet. Es handelt sich um ein für Kalzium-selektives Protein in der Zellmembran von zahlreichen nicht-exzitatorischen Zellen, das nach Entleerung der intrazellulären Speicher aktiviert wird (Parekh & Penner 1997).

2.6. Transiente Rezeptorpotential-Kanäle

Bei der Familie der transienten Rezeptorpotential-Kanäle (transient receptor potential; TRP) handelt es sich um eine Gruppe Ionen-permeabler, nichtselektiver

Kationenkanäle. Der erste Schritt ihrer Identifizierung kam durch Studien an den Photorezeptoren der Fruchtfliege (*Drosophila*) zustande. Der Photorezeptor besteht aus einem Rhodopsin-Rezeptor, der über ein G-Protein an eine PLC gebunden ist. Aktivierung von Proteinen in der Zellmembran der Photorezeptorzelle durch PLC führte zu einer Depolarisation (Hardie & Minke 1993, Ranganathan & Stevens 1995, Hardie & Minke 1995). Diese PLC-abhängige Depolarisation war in einer Fliegenmutante nicht permanent, sondern nur transient vorhanden. Folgeexperimente an dieser trp-Mutante zeigten, dass PLC-abhängige Kationenkanäle mutiert waren, die für den Einstrom von Kalzium und die daraus resultierende Depolarisation verantwortlich waren (Hardie & Minke 1992, Peretz et al. 1994).

Bei Säugern sind mehr als 20 verschiedene Kanalproteine, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den TRP-Proteinen der Fruchtfliege aufweisen, in unterschiedlichsten Zellen identifiziert worden (Harteneck et al. 2000, Clapham et al. 2003).

Jedes Mitglied der TRP-Familie besitzt sechs Transmembran-Domänen, welche Ähnlichkeit mit den Untereinheiten der Poren-bildenden Strukturen der spannungsabhängigen Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle besitzen. Die Kanäle sind Homo- oder Heterotetramere. Die Aminosäuren der fünften und sechsten Domäne bilden die Pore (Abb. 2). Die Architektur aus sechs Transmembranuntereinheiten und deren Strukturhomologie stellen gegenwärtig die einzigen Kriterien dar, die sie als TRP-Familie definieren. Aus diesem Grund sind mit einer weiteren Strukturanalyse und Aufklärung ihrer Funktionen neue nomenklatorische Erkenntnisse zu erwarten (Clapham et al. 2003). Gegenwärtig findet eine Nomenklatur Beachtung, die beim Säuger die TRP-Familien TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML und TRPA unterscheidet (Freichel et al. 2004).

Bei der Aktivierung des Kanals wird die Zelle depolarisiert, und es kommt zu einem intrazellulären Kalzium- und/oder Natriumanstieg. Infolge einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wird G-Protein-gekoppelt oder Tyrosinkinase-vermittelt über die PLC der Phosphoinositol-Zyklus aktiviert.

TRPC

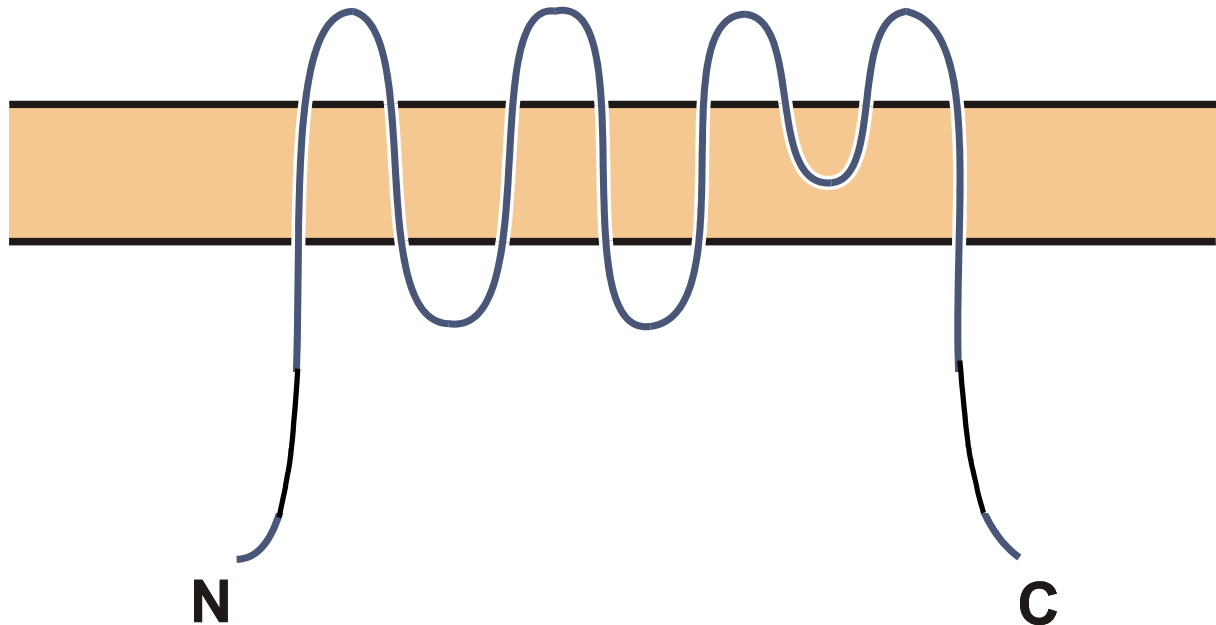


Abb. 2: Schematische Darstellung zur Lokalisation des transienten Rezeptorpotentialproteins vom „Canonical-Typ“ (TRPC) in der Zellmembran. Amino-terminales (N) bzw. Carboxy-terminales (C) Ende des Proteins.

2.6.1. Transientes Rezeptorpotentialprotein vom „Canonical-Typ“

Diese Familie der TRP-Canonical (TRPC) entspricht den „Classical TRPs“ (TRPC; Montell 2001) oder den „short-TRPs“ (Harteneck et al. 2000). Die Proteine dieser Familie weisen die höchste Homologie zu den TRP-Proteinen der Fruchtfliege auf. Es handelt sich um PLC-gesteuerte, nicht-selektive Kationenkanäle, wobei einige Mitglieder dieser Familie auch eine erhöhte Permeabilität für Kalziumionen aufweisen. Insgesamt sind sieben Isoformen bei den Säugetieren beschrieben, die als TRP1-7 oder TRPC1-7 bezeichnet werden (Tab. 1). Diese Isoformen können auf Basis ihrer primären Aminosäuresequenz und funktionalen Ähnlichkeiten in vier Untergruppen (TRPC1; TRPC 4/5; TRPC3/6/7 und TRPC2) eingeteilt werden (Clapham et al. 2003):

2.6.1.1. TRPC1

TRPC1 war das erste Protein, welches beim Säuger als Kanalprotein beschrieben wurde (Zhu et al. 1996). Es ist in der Lage, sich mit anderen TRPC Untereinheiten zu heteromeren TRP-Komplexen zu verbinden.

2.6.1.2. TRPC4 und TRPC5

Sie vermögen bei Mäusen mit der nahe verwandten Untergruppe TRPC1 heteromere Kationenkanäle zu bilden, deren Aktivierung nach einer Rezeptorstimulation von G_q-Proteinen (Okada et al. 1999) oder durch Tyrosinkinasen (Schaefer et al. 2000) erfolgt. TRPC4 und TRPC5 lassen sich nicht wie die anderen TRPCs über IP₃ und DAG aktivieren (Hofmann et al. 1999). Aus Versuchen an TRPC4-defizienten Mäusen weiss man, dass TRPC4 Kanalproteine essentiell für den ACh-vermittelten Kalziumeinstrom in Gefäßendothelien sind (Freichel et al. 2004).

2.6.1.3. TRPC3, TRPC6 und TRPC7

Sie fungieren als nicht selektive Kationenkanäle, durch die – abhängig vom Membranpotential – Ionen in beide Richtungen wandern können. Im Gegensatz zur zweiten Untergruppe sind sie durch DAG aktivierbar und weisen eine relativ geringe Selektivität zwischen Kalzium und Natrium bei gleichzeitiger Sensivität für intrazelluläres Kalzium auf (Hofmann et al. 1999). Sie finden sich zahlreich in glatter Muskulatur und Herzmuskulatur, was sie als aussichtsreiche Kandidaten für die nicht-selektiven Kationenkanäle dieser Zellen erscheinen lässt. Aus Versuchen an isolierten Trachealringen TRPC6-defizienter Mäuse ist eine erhöhte Kontraktilität der glatten Muskulatur auf ACh-Agonisten wie Metacholin beschrieben. An Gefäßmuskelzellen dieser Mäuse wurde ein im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erhöhter Kationeneinstrom ohne Stimulation, sowie nach DAG-Perfusion beschrieben. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Kontraktilität TRPC6-defizienter Mäuse ist die Bildung von homomere TRPC3-Kanalproteinkomplexen, da bei diesen Tieren die mRNA-Expression von TRPC3 um das zwei- bis dreifache erhöht ist (Freichel et al. 2004).

2.6.1.4. TRPC2

Über TRPC2 als eigene Untergruppe ist nur vergleichsweise wenig bekannt. Während der Kanal hinsichtlich seiner Sequenz nur zu etwa 30 % mit der vorgenannten Gruppe

überein stimmt, konnte die Existenz bisher zweifelsfrei lediglich bei Maus und Ratte belegt werden (Liman et al. 1999, Stowers et al. 2002).

Tab. 1: Übersicht über die verschiedenen Isoformen sowie bevorzugte Lokalisationen des transienten Rezeptorpotentialproteins vom „Canonical-Typ“ (TRPC).

Gruppe	Isoform	Länge (AS)	Zellen mit hoher Expression
1	TRPC1	759-810	Herz, Gehirn, Hoden, Ovarien
2	TRPC2 ¹	876-1172 ²	Vomeronasalorgan, Hoden
3	TRPC3	828-848	Gehirn
3	TRPC6	815-931	Lunge, Gehirn
3	TRPC7	862	Auge, Herz, Lunge
4	TRPC4	836-1077	Gehirn
4	TRPC5	966-975	Gehirn

¹ Mensch: TRPC2 ist ein Pseudogen; ² Rind: 432 AS

2.6.1.5. Vorkommen der TRPC-Proteine in der Lunge

Beim Mensch konnte sowohl in den glatten Muskelzellen der Atemwege, als auch in Bronchialepithelzellen TRPC1-, TRPC4- und TRPC6-Protein nachgewiesen werden. In glatten Muskelzellen konnte auch mRNA für das TRPC3-Protein gefunden werden (Corteling et al. 2003). Mittels RT-PCR konnte im Gefäßendothel der Lunge der Maus mRNA für TRPC1-, TRPC3-, TRPC4- und TRPC6-Protein detektiert werden (Tiruppathi et al. 2002). In der Lunge der Maus konnte auch die cDNA von TRPC7 nachgewiesen werden (Okada et al. 1999).

2.6.2. Transientes Rezeptorpotentialprotein vom „Vanilloid-Typ“

Bei den TRPV (auch osm-9-like-Familie) handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die nach dem Vanilloid-Rezeptor 1, dem ersten Mitglied dieser Gruppe, benannt wurden. Die sechs Vertreter dieser Gruppe sind drei Unterfamilien zugehörig. TRPV1 und 2 repräsentieren die Vanilloid-Rezeptoren (VR-1) und Vanilloid-like-Rezeptoren (VRL-1).

Der TRPV1 ist durch die Vanilloidkomponente Capsaicin erregbar. Der auch als osm-9-like OTRPC4 bezeichnete TRPV4 und TRPV3 spielen eine Rolle bei der neuronalen

Schmerz- und Temperaturempfindung. Offenbar werden diese Kanäle, die nur eine moderate Kalziumionenselektivität zeigen, durch Veränderungen der Osmolarität der Zelle aktiviert. Schließlich lassen sich die kalziumselektiven Kanäle TRPV5 und 6 (synonym ECaC1 und ECaC2) zur letzten Untergruppe vereinigen. Sie werden auch über die Kalziumionenkonzentration reguliert, wenngleich eine Kalziumspeicherentleerung hierfür nicht die Voraussetzung ist (Clapham et al. 2003).

2.6.3. Transientes Rezeptorpotentialprotein vom „Melastatin-Typ“

Die Unterfamilie TRPM ist nach Melastatin, einem Tumor-Suppressor-Protein benannt. Die acht Vertreter der TRPMs sind vier Untergruppen zugeordnet. Mit TRPM4 und 5 finden sich die einzigen Vertreter innerhalb der TRPs, die selektive Kanäle für monovalente Kationen darstellen. Einige Vertreter wie TRPM8 werden im Gegensatz zur vorherigen Gruppe durch kühle Temperaturen oder kühlende Substanzen aktiviert. Der TRPM-Familie wird Bedeutung bei der Kalzium abhängigen Signalkaskade, bei der Kontrolle von Zellzyklus und Zellteilung sowie der Thermosensorik beigemessen (Clapham et al. 2003).

3. Material und Methoden

3.1. *Material*

3.1.1. Tiere

Die Untersuchungen wurden an FVB-Mäusen (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) unterschiedlichen Geschlechts im Alter von vier bis zwölf Wochen mit einem Gewicht zwischen 20 und 35 g durchgeführt. Die Tiere waren in Makrolonkäfigen unter Standardbedingungen im Versuchstierstall des Instituts für Physiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen untergebracht.

3.1.2. Pharmaka

3.1.2.1. U 46619

Das Thromboxan A₂-Analogon U 46619 (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland) war in Ethanol gelöst und wurde damit weiter auf Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-7} M verdünnt. Davon wurden Aliquots zu je 40 oder 100 µl bei -20°C gelagert. Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurden Verdünnungsreihen zur Etablierung des Systems in der Inkubationszelle getestet, wobei sich Endkonzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-5} M ergaben. Im späteren wurde U 46619 als Kontrollsubstanz in der Kammer in einer Endkonzentration von 10^{-5} M eingesetzt.

3.1.2.2. Muskarin-Chlorid

Der muskarinische Rezeptoragonist wurde laut Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich Chemie) in *Aqua ad injectabilia* gelöst. Angefertigt wurden Aliquots in einer Konzentration von 10^{-2} M zu je 100 µl. Diese Aliquots wurden zum Teil unmittelbar vor ihrem Einsatz mit Medium auf 10^{-3} oder 10^{-4} verdünnt. Die eingesetzten Endkonzentrationen betrugen 10^{-4} M bis 10^{-8} M.

3.1.2.3. Thapsigargin

Der Blocker der Kalzium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums (Sigma-Aldrich Chemie) war bereits in Ethanol gelöst. Die Substanz wurde weiter in Ethanol verdünnt und in Aliquots zu je 100 µl in einer Konzentration von 10^{-3} M angesetzt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C . Eingesetzt wurden Konzentrationen von

10^{-5} M sowohl zur Vorinkubation der Schnitte, als auch in der Inkubationskammer.

3.1.2.4. SKF 96365

Der Blocker spannungsunabhängiger (VICCs) Kalziumkanäle wurde laut Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich Chemie) in *Aqua ad injectabilia* gelöst. Die Lösung wurde in 20 µl großen Aliquots einer Konzentration von 10^{-2} M bei -20 °C tief gefroren. Entnommen wurden hier jeweils 2 µl zum direkten Einsatz in der Inkubationskammer, welches eine Endkonzentration von 10^{-5} M ergab.

3.1.2.5. Verapamil

Der Blocker spannungsabhängiger Kalziumkanäle der glatten Muskulatur (L-type VOCCs) wurde laut Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich Chemie) in *Aqua ad injectabilia* gelöst. Aliquots zu 200 µl wurden in einer Konzentration von 10^{-4} M im Kühlschrank aufbewahrt. Für eine Endkonzentration von 10^{-5} M kamen 200 µl in der Inkubationskammer zum Einsatz.

3.1.2.6. Nitroprussid-Natrium

Eine Ampulle Nitroprussid-Natrium (Nipruss[®], Schwarz-Pharma, Zwickau, Deutschland) mit 42,75 g Trockensubstanz (entsprechend 60 mg Nitroprussid-Natrium x 2H₂O) wurde in 20 ml *Aqua ad injectabilia* gelöst und in einem dunklen Plastikröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bei 4 °C gelagert. Von dieser Substanz wurden 149 µl (entspricht 0,15 µM in 20 ml Spüllösung) der Spüllösung für die Gefäße zugesetzt.

3.1.3. Lösungen und Zellkulturmedien

3.1.3.1. Aqua ad injectabilia (Ampuwa[®])

Als Wasser für Injektionszwecke zum Lösen der Substanzen diente Ampuwa[®] (B. Braun, Melsungen, Deutschland).

3.1.3.2. Spüllösung für die Gefäße

Für die Spüllösung wurden 20 ml Krebs-Ringer-Lösung mit 200 µl Natrium-Heparin (Liquemin[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Weylen, Deutschland) mit 25000 I.E./ml verwendet. Dieser waren 100 µl einer Penicillin (10000 U/ml) -Streptomycin (10 mg/ml) -Lösung (PAA Laboratories, Linz, Österreich) zugesetzt. Unmittelbar vor ihrem Einsatz wurden 149 µl Nitroprussid-Natrium zugegeben.

3.1.3.3. Agarose

Die Agarose (Low Melt Preparative Grade Agarose, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) wurde direkt vor der Präparation durch mehrfaches Aufkochen in Krebs-Ringer-Lösung gelöst. Hergestellt wurde 1,6 % Agarose zum Füllen der Luftwege. Anschließend wurde diese bis zu ihrem Gebrauch bei 37 °C im Inkubator gelagert.

3.1.3.4. EARLE`s Minimal Essential Medium

Zur Aufbewahrung der Schnitte und in der Inkubationszelle wurde steriles EARLE`s Minimal Essential Medium (MEM; PAA Laboratories) eingesetzt, dem als pH-Indikator Phenolrot zugesetzt war.

3.1.3.5. Krebs-Ringer-Lösung

Für einen Liter Krebs-Ringer-Lösung wurden die folgenden Salz- und Zuckerkonzentrationen (alle Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet:

Kaliumchlorid: 0,35 g

Natriumchlorid: 7,8 g

Natriumdihydrogenphosphat x 2 H₂O: 0,21 g

Natriumhydrogencarbonat: 1,37 g

Magnesiumsulfat x 7 H₂O: 0,15 g

D-Glukose: 1,4 g

Die Salze wurden in einem Liter destillierten Wasser gelöst. Nach fünfminütiger Begasung mit Carbogen (5 % Kohlendioxid in Sauerstoff, Messer Griesheim, Krefeld) wurden 2,8 ml Calciumchlorid-Lösung (1 M, Merck) zugesetzt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

3.1.3.6. Phosphate buffered saline (PBS)

Folgende Salze (alle Merck) wurden in einem Liter destillierten Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt:

Kaliumhydrogenphosphat: 2,72 g

Natriumhydrogenphosphat: 14,24 g

Natriumchlorid: 9 g

3.1.3.7. Paraformaldehyd (PFA) 4 %

Für einen Liter Paraformaldehyd wurden 40 g Paraformaldehyd (Merck) in 400 ml destilliertem Wasser langsam auf ca. 70 °C erhitzt. Anschließend wurden einige Tropfen 2 M Natronlauge (Merck) zugegeben, bis die Lösung klar war. Nach der Zugabe von 500 ml 0,2 M Phosphat-Puffer (3.1.3.8.) wurde der pH auf 7,2 bis 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

3.1.3.8. Phosphatpuffer

Für einen 0,2 M Phosphatpuffer wurden 115 ml 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat (Merck) mit 385 ml 0,2 M Natriumhydrogenphosphat (Merck) gemischt.

Zur Herstellung des 0,1 M Phosphatpuffers wurden zu den oben hergestellten 500 ml noch 500 ml Aqua dest. zugegeben und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

3.1.3.9. gepuffertes Glycerol

Eine 1,5 M Natriumhydrogenkarbonatlösung (Merck) wurde mit 1,5 M Natriumkarbonatlösung (Merck) auf pH 8,6 eingestellt. Anschließend wurde es zu gleichen Teilen mit wasserfreiem Glycerol (Merck) gemischt.

3.1.3.10. DNase I Reaktionspuffer

Der DNase I Reaktionspuffer (Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Deutschland) war wie folgt zusammengesetzt:

200 mM Tris-Salzsäure (pH 8,4)

20 mM Magnesiumchlorid

500 mM Kaliumchlorid

3.1.3.11. 10 x PCR Puffer II

Der 10 x PCR Puffer II (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) besteht aus:

100 mM Tris-Salzsäure (pH 8,3)

500 mM KCL

3.1.3.12. 5 x First-Strand Puffer

Der 5 x First-Strand Puffer (Invitrogen life technologies) setzte sich wie folgt zusammen:

250 mM Tris-Salzsäure (pH 8,3)

375 mM Kaliumchlorid

15 mM Magnesiumchlorid

3.1.4. Antiseren

Tab. 2: Bei der Immunhistochemie verwendete primäre Antiseren; Antigen

Antigen	Wirt	Verdünnung	Fixierung	Hersteller
Human TRPC1	Kaninchen	1:50	Azeton	Almone Lab., Jerusalem, Israel
Maus TRPC3	Kaninchen	1:400	Azeton	s. o.
Maus TRPC4	Kaninchen	1:400	PFA	s. o.
Maus TRPC6	Kaninchen	1:600	PFA	s. o.
α -smooth muscle actin, FITC konjugiert	Maus	1:500		Sigma Aldrich

Tab. 3: Bei der Immunhistochemie verwendete Sekundärseren

Reagenz	Konjugat	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG	FITC	Ziege	1:400	Cappel, Ohio, USA
Anti-Kaninchen IgG	Cy-3	Affe	1:3000	Dianova, Hamburg, Deutschland

3.1.5. Primer

Tab. 4: Bei der PCR verwendete Primer

Amplifikon	Primer Sequenz	Produkt- größe (Bp)	Accession-Nr.
TRPC1	Forward primer Reverse primer		
	624 ggatgtgCGagaggtgaagga 644	383	NM_011643
	acaggtgCGacatccatcggt		
	bei α 1008 – 987	383	U73625 (α)
	bei β 906 – 885	281	U95167 (β)
TRPC2	bei γ 853 – 832	228	U95168 (γ)
	bei δ 751 - 730	126	U95169 (δ)
TRPC3	2708 acggcatctttaccatcgtc 2727	117	NM_011644
	2825 gagCGagcaaacttcactc 2806		
TRPC4	2427 taagagccaagCGacgagga 2447	272	NM_019510
	2698 gccgaggtcaactgctggaac 2678		
TRPC5	bei α : 2410 gacatttctagcttccgcttcg 2431	394 (α)	NM_016984
	2804 gccgctgttgacgagtaat 2785		
	bei β : 2410 – 2431	142 (β)	
	2552 – 2533		
	nur α :		
TRPC6	2605 gcctccgagagacataacctaagc 2628	173	U50921
	2778 tgaaacagagaagatttggttgc 2755		
TRPC7	2672 tgcttgacctcttggaaca 2692	371	NM_009428
	3043 cctgccacatacaatgctgct 3023		
TRPC8	1364 ccgtccaaatctcagccgttta 1385	572	NM_013838
	1937 tgccagaacgccataaatcttg 1916		
TRPC9	1215 gcagcaagctaggacaaacc 1234	200	NM_012035
	1396 tctccgtccaggagaactgt 1415		

3.2. Methoden

3.2.1. Videomorphometrie

3.2.1.1. Präparation der Maus

Die Maus wurde mit Hilfe einer Pinzette durch Genickbruch getötet und anschließend mit Kanülen auf einem Styroporbrett in Rückenlage fixiert. Nach Durchtrennen des Fells in Längsrichtung vom Nabel bis zum Kinn wurde die Bauchhöhle eröffnet. Um ein möglichst vollständiges Ausbluten des Tieres zu erreichen, erfolgte die Durchtrennung der Bauchaorta. Durch eine Stichinzision des Zwerchfells wurde die Lunge zum Kollabieren gebracht, um den Thorax auf Höhe der Rippen-Rippenknorpelgrenze einschließlich des Schultergürtels eröffnen zu können. Anschließend erfolgte die Freipräparation der Trachea, welche mit einem Ligaturfaden fixiert und oberhalb davon quer inzidiert wurde. Durch transkardiale Perfusion der Lungengefäße wurde das Blut entfernt. Dazu wurde der Zylinder einer Perfusorspritze mit 20 ml Spüllösung befüllt und diese über eine Heidelberger-Verlängerung mit einer Einwegkanüle über den rechten Ventrikel bzw. direkt über den *Truncus pulmonalis* in den Lungenkreislauf eingeführt. Ein Abfluss wurde über ein Loch im linken Ventrikel geschaffen. Die Plastikmanschette einer Venenverweilkanüle der Größe 1,1 x 33 mm (Vasocan® Braunüle®, B. Braun) wurde in die Öffnung der Trachea eingeführt und dort mit einer Pinzette fixiert. Aus einer daran angeschlossenen 2 ml Einwegspritze wurden 2-3 ml der Agaroselösung (1,6 %) bis zum vollständigen Entfalten der Lunge in die Luftwege gefüllt. Um den Rückfluss der Agaroselösung zu verhindern, erfolgte der Verschluss der Trachea durch einen Ligaturfaden. Nach der Durchtrennung der Trachea oberhalb des Ligaturfadens wurden Lunge und Herz zusammenhängend herauspräpariert. Die Organe wurden sofort in eiskalte Krebs-Ringer-Lösung überführt, um die Agarose abzukühlen und auszuhärten.

3.2.1.2. Gewebepräparation

Die Herstellung der 200-250 µm dicken Lungenschnitte erfolgte mit einem Mikrotom (Vibratom®, Vibrating Blade Tissue Slicer, VT 1000S, Leica, Bensheim, Deutschland), welches zunächst für den Schneidevorgang vorbereitet wurde. Die Vibrationswanne, die zur Desinfektion ihrer Oberfläche in einem UV-Schrank aufbewahrt wurde, musste im Vibratom® installiert werden. Die Verbindungsschläuche zur Kühlanlage wurden angeschlossen und die Kühlung vor

Beginn der Präparation eingeschaltet. Die Wanne wurde mit knapp 200 ml Krebs-Ringer-Lösung randvoll befüllt, und die Schneidevorrichtung mit einer halbierten Rasierklinge bestückt und angeschraubt. Anschließend wurde sie soweit heruntergefahren, dass die Klinge in die kalte Krebs-Ringer-Lösung eintauchte. Zur Einstellung des Mikrotoms wurde die Schnittdicke auf 200 bis 250 µm eingestellt, das Programm für fortlaufende Schnitte und die Geschwindigkeit zwischen 5 und 6 sowie die Frequenz auf 10 festgelegt. Der Objektträger wurde mittig mit einem halbrunden Korken von ca. 1,5 cm Dicke mit Hilfe von Sekundenkleber (UHU GmbH, Bühl, Deutschland) beklebt.

Ein kompletter Lungenlappen der auf 4 °C abgekühlten Lunge wurde mit einer Schere abgetrennt und mit seiner *Facies diaphragmatica* an den Korken angelegt, der *Margo acutus* war dabei nach oben ausgerichtet und die *Facies medius* wurde auf dem Objektträger mit Hilfe des Sekundenklebers fixiert.

Zur Herstellung der Lungenschnitte wurden ausschließlich der *Lobus cranialis* der rechten Lunge sowie der *Lobus sinister* verwendet. Nach Justierung der Schneidevorrichtung wurden pro Lappen 10 bis 20 Serienschnitte angefertigt, die bis zum Ende des Schneidevorgangs in der mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllten Vibrationswanne belassen wurden.

3.2.1.3. Aufbewahrung der Gewebepreparate

Nach Abschluss des Schneidevorgangs konnten die Lungenschnitte mit Hilfe einer Pinzette in ein Becherglas mit MEM (1 % Penicillin/Streptomycin) überführt werden. Dieses war zuvor in einem 37 °C warmen Inkubationsschrank erwärmt und mit einem Normoxie-Gasgemisch (73,7 % Stickstoff, 21 % Sauerstoff, 5,3 % Kohlendioxid) begast worden. Für die nächsten zwei bis drei Stunden wurden die Schnitte in dem Inkubationsschrank bei 37 °C unter ständiger Begasung (s. o.) aufbewahrt. Mit den Lungenschnitten konnte weiter gearbeitet werden, wenn das Agarosegel komplett aus den Schnitten herausgewaschen war und die Schnitte an den Boden des Becherglases sanken.

3.2.1.4. Videomikroskopische Untersuchungen der Gewebepreparate

Das Testen der Substanzen erfolgte in einer speziell dafür angefertigten Inkubationskammer (Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland; Abb. 3), die auf dem Objektträger eines Mikroskops (Leica; DMIL) fixiert war (Abb. 3). In der aus Plexiglas gefertigten Kammer befanden sich im Zentrum (A) zwei Inkubationszellen,

von denen jeweils nur eine für den Versuch mit MEM gefüllt war. Dieses wurde unter ständiger Begasung mit einem Normoxie Gasgemischs (s. o.) über den Zulauf (e) der Zelle zugeleitet. Ein Lungenschnitt konnte darin mit Hilfe eines Metallbügels fixiert werden. Über Zulauf (e) und Abfluss (f), die an ein Pumpsystem (Gilson[®], Miniplus 3, Abimed) angeschlossen waren, erfolgte ein kontinuierlicher Austausch des Mediums. Das Flüssigkeitsvolumen in der Kammer lag dabei relativ konstant bei 2 ml. Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte nach Abstellen der Pumpe durch direkte Applikation in das Kammermedium. Durch das die Zellen umgebende Wasserbad (B) konnte während des Versuchs eine Temperatur von 37 °C aufrecht erhalten werden.

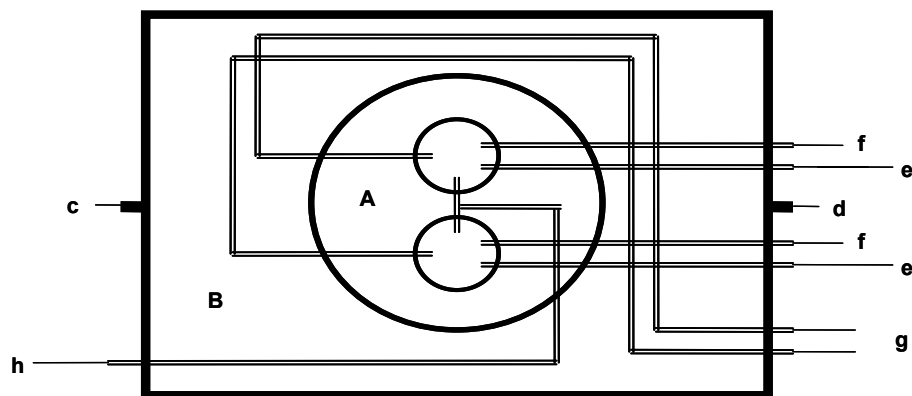


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Inkubationskammer.

- A. Innenraum der Kammer mit zwei Inkubationszellen jeweils mit Zulauf (e), manuell zu bedienendem Abfluss (f) und Ablauf (g).
- B. Wasserbad mit Wasserzu- (c) und –ablauf (d).

3.2.1.5. Bilderfassung und Bildverarbeitung

Die Bilderfassung erfolgte mit einer speziellen Software (Optimas, Version 6.5, Stemmer, Puchheim, Deutschland). Die Bilder der in die Kammer in MEM eingelegten Schnitte konnten mit Hilfe eines inversen Mikroskops bei 40-facher Vergrößerung und einer daran angeschlossenen Digitalkamera (Stemmer) auf den Computer übertragen werden. Zunächst mussten die Schnitte nach geeigneten Anschnitten von Bronchioli durchmustert werden. Als Auswahlkriterien wurden dabei folgende Punkte zugrunde gelegt: Mindestens ein Querschnitt eines Bronchiolus musste in einem Gesichtsfeld zu sehen sein; der Gewebeverband musste intakt sein; es durften sich keine Reste von Agarose, Blutzellen oder Zelltrümmern im Lumen der

Luftwege finden und der Schnitt musste vital sein, was anhand der Zilienaktivität im Bronchiolus bei 400-facher Vergrößerung und der Reaktivität auf Muskarinapplikation gemessen wurde.

Der Durchmesser der für die Auswertung herangezogenen Bronchioli lag zwischen 100–500 µm. Grundsätzlich wurden die Schnitte nur am Tag ihrer Herstellung verwendet, obwohl der Zilienschlag in den Bronchioli noch bis 4 Tage nach der Präparation nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurde das Mikroskop für die Kamera justiert, so dass auf dem Computermonitor ein brauchbares Bild entstand. Vor dem weiteren Vorgehen, wurde eine Wartezeit von etwa 4–10 Minuten zur Adaptation des Schnittes eingehalten. In dieser Zeit wurde der Schnitt ständig mit frischem Medium umspült. Die Pumpe war dabei auf Stufe 4 eingestellt, was einer Flüssigkeitsmenge von 0,5 ml/min entsprach. Nach dieser Zeit wurde das erste Bild (ohne Substanz) gespeichert, welches später zur Ermittlung der Referenzwerte diente. Die Pumpe wurde daraufhin abgestellt und es erfolgte die Zugabe der zu testenden Substanz in das Medium der Inkubationszelle. Nun wurden Aufnahmen im Abstand von einer Minute gespeichert, um Reaktionen von Bronchioli zu beobachten. Mit Hilfe des Rapid-Programms der Pumpe war es möglich, innerhalb von 10 Minuten die getestete Substanz wieder vollständig aus der Inkubationskammer zu entfernen.

3.2.1.6. Bildauswertung

Die Bilder wurden mit Hilfe des Analyseprogramms (Stemmer) ausgewertet. Damit war es möglich, Umrisse um einen definierten Vordergrund, in diesem Fall die Fläche des Bronchiolus, nach entsprechender Einstellung des Schwellenwerts zu erkennen. Nach vorheriger Kalibrierung der Bildmaße des Computerbildes auf die originalen Größenverhältnisse im Mikroskop mit einem Eichmaßstab konnten die erkannten Flächen vermessen und in ihren originalen Größen wiedergegeben werden. Für die Auswertung wurden sowohl der Flächeninhalt sowie der relative Durchmesser herangezogen. Die aus dem ersten Bild ermittelten Flächeninhalte des Bronchiolus wurden mit 100 % gleichgesetzt und dienten als Referenzwerte, alle weiteren ermittelten Daten konnten ins Verhältnis gesetzt werden. Die Ergebnisse der Versuche an den einzelnen Lungenschnitten einer Versuchsreihe wurden gemittelt und mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in Diagrammen dargestellt.

3.2.2. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Für die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurde der rechte craniale Lungenlappen von sechs durch Genickbruch getöteten FVB-Mäusen verwendet. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2.1. Reverse Transkriptase

Das Gewebe wurde gewogen und in RNazol (2 ml RNazol auf 100 g Gewebe; WAK-Chemie, Bad Homburg, Deutschland) homogenisiert. Der Homogenisator wurde zuvor für mindestens eine halbe Stunde in Wasserstoffperoxid (3 %) eingelegt und anschließend mit *Aqua dest.* gespült. Das Homogenat wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgeteilt und auf Eis kühl gestellt. Jedem Ansatz wurden 10 % des Homogenatvolumens an Chloroform (Merck) zugesetzt. Nach dem Durchmischen wurde der Ansatz 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 4 °C, 15 Minuten zentrifugiert (13.000 rpm). Zur Fällung der RNS musste die obere, klare Phase abgenommen und eine gleiche Menge Isopropanol (Merck) zugesetzt werden. Nach dem Durchmischen wurde der Ansatz mindestens 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (13.000 rpm). Nach Verwerfen des Überstandes wurde die RNS mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und nochmals 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (7.500 rpm). Nach vorsichtigem Entfernen des überschüssigen Ethanols wurde die verbleibende RNS 10-20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, das RNS-Pellet in 20-100 µl *Aqua ad injectabilia* gelöst, die RNS-Konzentration photometrisch bestimmt und bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde mittels Desoxyribonuclease (DNase I, Invitrogen Life technologies) die noch im Ansatz enthaltene DNS verdaut. Dafür wurde zu 1 µg RNS je 1 µl 10 x DNase I Reaktionspuffer und DNase I zugesetzt und mit *Aqua ad injectabilia* auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde in einem Cycler (Mastercycler, Eppendorf) für 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA (Invitrogen Life technologies) 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Dem Ansatz wurden 1 µl RT-Primer (Oligo-dT₁₂₋₁₈; 500 µg/ml; MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und 1 µl dNTPs (10 mM; Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) zugegeben, und er wurde weitere 10 Minuten bei 65 °C im Cycler belassen. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend auf Eis gestellt.

Dem Ansatz wurden 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT; Invitrogen Life technologies) und 1 µl *Aqua ad injectabilia* zugegeben, und er wurde für 2 Minuten bei 42 °C in den Cyclor verbracht. Die reverse Transkription der RNS erfolgte nach Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase (200 U; SuperScriptTM II RT; Invitrogen Life Technologies) weitere 50 Minuten bei 42 °C. Abschließend wurde die Reaktion durch 15 Minuten Erwärmung auf 70 °C inaktiviert.

3.2.2.2. Polymerase Kettenreaktion

Die für die Primer spezifische cDNS-Sequenz wurde mittels einer PCR amplifiziert. Der PCR Ansatz für TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPC7 enthielt jeweils 1 µl cDNS, 2,5 µl PCR Puffer II, 1,5 µl Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM), 0,5 µl Taq Polymerase (2 U/µl; Amplitaq Gold Polymerase; alle Applied Biosystems), 1 µl dNTP (10 mM; Amersham Bioscience Europe GmbH) und je 0,5 µl Sense-Primer und Antisense-Primer (Tab. 4). Anschließend wurde der Ansatz mit *Aqua ad injectabilia* auf 25 µl aufgefüllt.

Der PCR Ansatz für TRPC6 enthielt jeweils 1 µl cDNS, 2,5 µl PCR Puffer II, 1 µl Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM), 0,1 µl Taq Polymerase (2 U/µl; Amplitaq Gold Polymerase; alle Applied Biosystems), 1 µl dNTP (10 mM; Amersham Bioscience Europe GmbH) und je 0,5 µl Sense-Primer und Antisense-Primer (Tab. 4). Auch dieser Ansatz wurde anschließend mit *Aqua ad injectabilia* auf 25 µl aufgefüllt.

An eine zwölf Minuten dauernde Denaturierung bei 95 °C schlossen sich 40 Zyklen mit 20 Sekunden bei 95 °C (Schmelzen der DNS), 20 Sekunden bei 61-65 °C (Anlagerung der Primer) sowie 30 Sekunden bei 72 °C (Bildung neuer Stränge) an. Beendet wurde die Reaktion durch eine 7 Minuten dauernde Erwärmung auf 72 °C. Als Positiv-Kontrolle (Nachweis funktionierender Primer) wurde die PCR an einer Probe mit cDNS aus Mäusehirn sowie einer Negativ-Kontrolle ohne cDNS (Nachweis auf Kontaminationsfreiheit der verwendeten Puffer etc.) durchgeführt. Als Kontrolle auf eventuelle DNS Verunreinigungen der Proben wurde pro Primer jeweils ein Gefäß mit Material ohne vorherige RT einer PCR unterzogen. Zusammen mit dem Ansatz wurde ein 2 % Agarosegel (Inotrain, Kronberg, Deutschland) mit den Ansätzen sowie einem 100 Basenpaarmarker (Invitrogen life technologies) beladen und 1 Stunde bei 140 Volt laufengelassen. Zur Markierung der DNS wurde dem Agarosegel zuvor 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 %; Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) auf 150 ml Gel zugesetzt. Die Geldokumentation erfolgte über Photographie der fluoreszierenden Banden.

3.2.3. Immunhistochemie

3.2.3.1. Gewebepräparation der Maus

Sieben FVB-Mäuse wurden wie in Kapitel 3.2.1.1. beschrieben, getötet und präpariert. Auf die transkardiale Perfusion der Lungengefäße wurde verzichtet. Die Lungen wurden transtracheal mit einem Gemisch aus Saccharoselösung (18 %) und Tissue Tek (O.C.T. Compound 4583, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) gefüllt. Lunge und Herz wurden als Paket entnommen und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.3.2. Anfertigung der Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte der entnommenen Thoraxpakete wurden mit einem Kryostat (Jung Frigocut 1900 E, Leica) bei -20 °C angefertigt. Dafür wurden die bei -80 °C aufbewahrten Präparate im Innenraum des Kryostaten mit Tissue-Tek auf einen Probenhalter aufgeblockt und Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Nach dem Anschneiden der Proben wurden die Schnitte vorsichtig auf bei Raumtemperatur gelagerte Objektträger aufgezogen.

3.2.3.3. Fixierung und Färbung

Die Wahl des Fixierungsreagenz ist abhängig vom Primärantikörper. Daher wurden die Präparate abhängig vom Primärantiserum entweder zehn Minuten bei -20 °C in Azeton fixiert, oder 20 Minuten bei Raumtemperatur in PFA 4 % fixiert. Nach der Fixierung mit Azeton wurden die Objektträger luftgetrocknet. Die mit Paraformaldehyd fixierten Objektträger wurden anschließend für 20 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde mit einer Blocklösung, bestehend aus PBS mit 10 % Schweineserum, 0,1 % Rinderserum Albumin und 0,5 % Tween 20, überschichtet und nachfolgend in PBS gewaschen. Während der Inkubation wurden die Objektträger in feuchten Kammern aufbewahrt um ein Verdunsten der aufgetragenen Lösungen zu verhindern.

Diesem Schritt folgte die Inkubation mit den Primärseren (Tab. 2) über Nacht. Nach folgendem Waschen der Objektträger in PBS wurden sie für eine Stunde mit den

Sekundärseren (Tab. 3) beschichtet. Für die Doppelimmunfluoreszenz wurden die Schnitte über Nacht mit den TRPC-Antiseren in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen glattmuskuläres Aktin inkubiert.

Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Objektträger in PBS gewaschen und mit Carbonat gepufferten Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt.

3.2.3. Statistische Auswertung

Die videomorphometrisch gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0 einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Für die Auswertung der Daten wurden die nicht- parametrischen Tests für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney durchgeführt. Beobachtete Differenzen wurden bei $p < 0,05$ als signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1. Videomikroskopisch untersuchte Lungenschnitte

Die präparierten Lungenschnitte wurden mikroskopisch untersucht. In Abb. 4 ist ein für die Auswertung herangezogener Bronchiolus zu Beginn des Versuchs dargestellt.

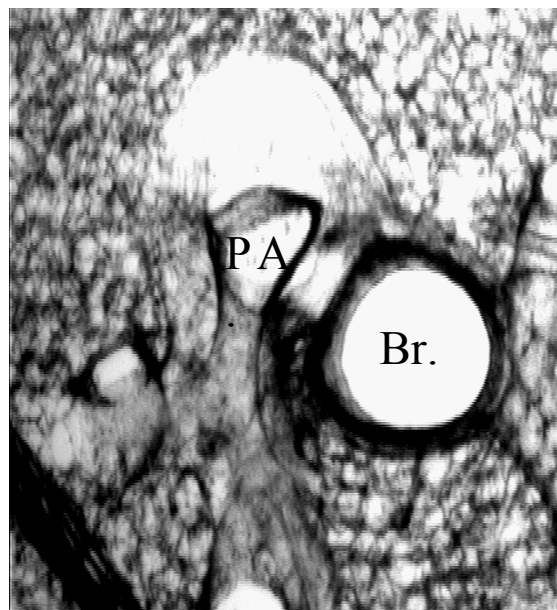


Abb. 4: Videomikroskopische Aufnahme eines 220 µm dicken Lungenschnittes der Maus. Zu sehen sind ein quer geschnittener peripherer Bronchiolus (Br.) und eine benachbarte, etwas längs getroffene Pulmonalarteriole (PA.), die aus ihrem Gewebezusammenhang heraus gelöst ist. In der Umgebung befinden sich angeschnittene Alveolen, man blickt auf die Schnittflächen der Alveolenwände und in die Alveolen hinein.

In Abb. 5 ist ein Versuchsablauf dargestellt. Zu erkennen ist eine deutliche Reduktion der luminalen Fläche des Bronchiolus fünf Minuten nach Applikation von Muskarin (10^{-4} M). Durch Spülung der Inkubationszelle wurde der Agonist entfernt und der Bronchiolus erweiterte sich auf die Ausgangsgröße. Der experimentelle Aufbau zeigt einen bekannten Effekt der reversibel ist, was die Verwendbarkeit der benutzten

Hard- und Software, das richtige Zeitfenster sowie die geeignete Applikationsmethode bestätigt.

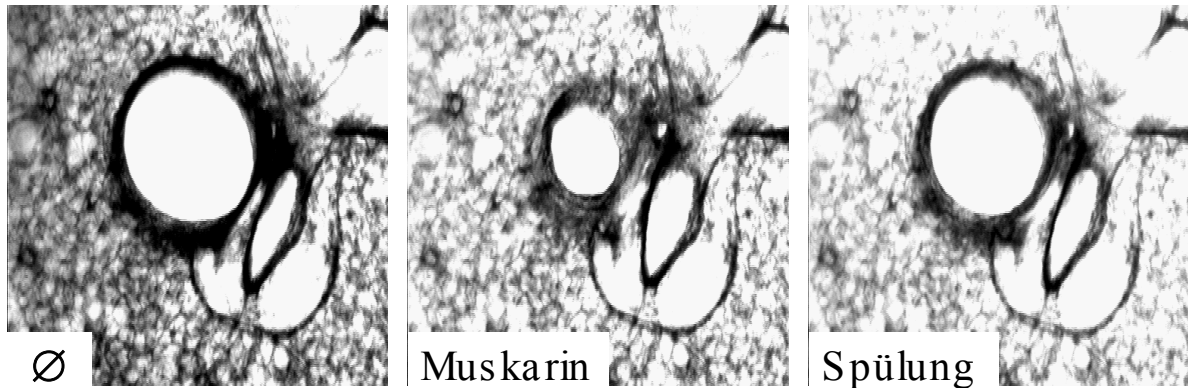


Abb. 5: Videomikroskopische Aufnahmen eines 220 µm dicken Lungenschnittes der Maus. Zu sehen sind ein peripherer Bronchiolus und eine benachbarte Pulmonalarteriole vor (Ø), während Muskarinrezeptorstimulation mit Muskarin 10^{-4} M über 5 Minuten (Muskarin) und nach 15 minütiger Spülung der Inkubationszelle mit Medium (Spülung).

4.1.1. Kontrollversuche

Die Kontrollversuche wurden an insgesamt fünf verschiedenen Lungenschnitten ($n=5$) von drei Mäusen durchgeführt. An diesen wurde die Reaktion der Bronchioli auf Muskarin 10^{-4} M mit der Wirkung des Thromboxan-Analogon U46619 10^{-5} M verglichen (Abb. 6). Der Durchmesser der Bronchioli betrug zu Beginn des Versuchs 324 ± 48 µm.

Wie Abb. 6 zeigt reagieren die Bronchioli auf die Applikation von Muskarin (10^{-4} M) mit einer schnellen initialen und lang anhaltenden Konstriktion, die derjenigen des Thromboxan-Analogons U 46619 (10^{-5} M) ähnelt. Nach zehn minütigem Auswaschen der Substanzen aus der Inkubationszelle erreichen die Bronchioli wieder annähernd ihre Ausgangsgröße.

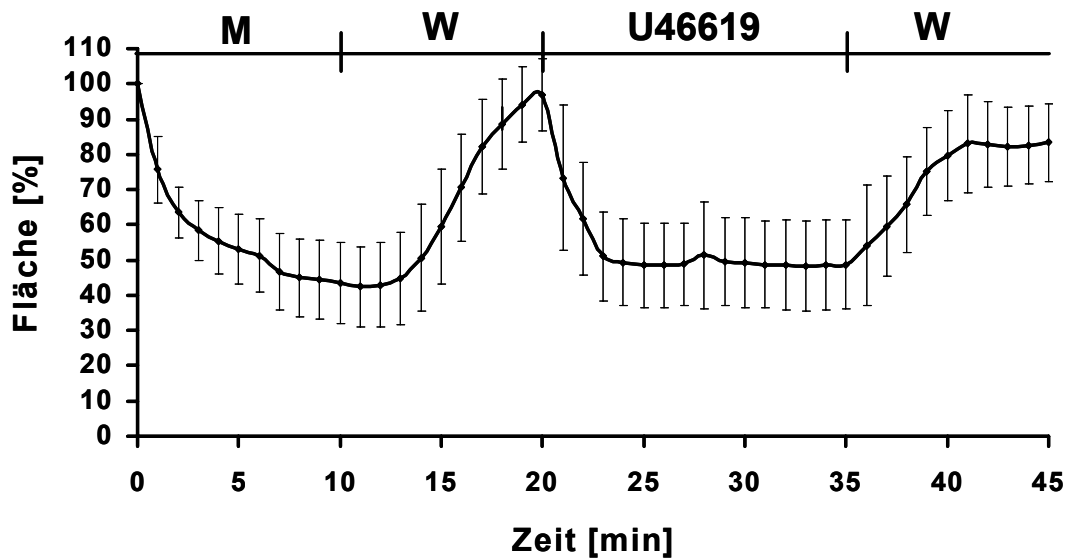


Abb. 6: Änderung der luminalen Fläche (Durchmesser Bronchioli $324 \pm 48 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=5$) und SEM nach Zugabe von Muskarin 10^{-4} M (M) und U46619 10^{-5} M (U46619), sowie der Spülvorgang (W) zum Entfernen der Substanzen aus der Inkubationszelle.

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Wirkung von Muskarin auf murine Bronchioli dosisabhängig ist. Hierzu wurde eine kumulative Applikation verschiedener Muskarinkonzentrationen in einer Versuchsreihe an insgesamt vier verschiedenen Lungenschnitten ($n=4$) von zwei Mäusen durchgeführt. Der gemittelte Durchmesser der hier ausgewerteten Bronchioli lag zu Beginn des Versuchs bei $320 \pm 86 \mu\text{m}$. In Abb. 7 erkennt man die unmittelbare, dosisabhängige plateauartige Konstriktion der Bronchioli nach Applikation von Muskarin auf bis zu 30 % des ursprünglichen Flächeninhalts. Diese Reaktion konnte durch das Herauswaschen des Muskarins mit Medium wieder aufgehoben werden.

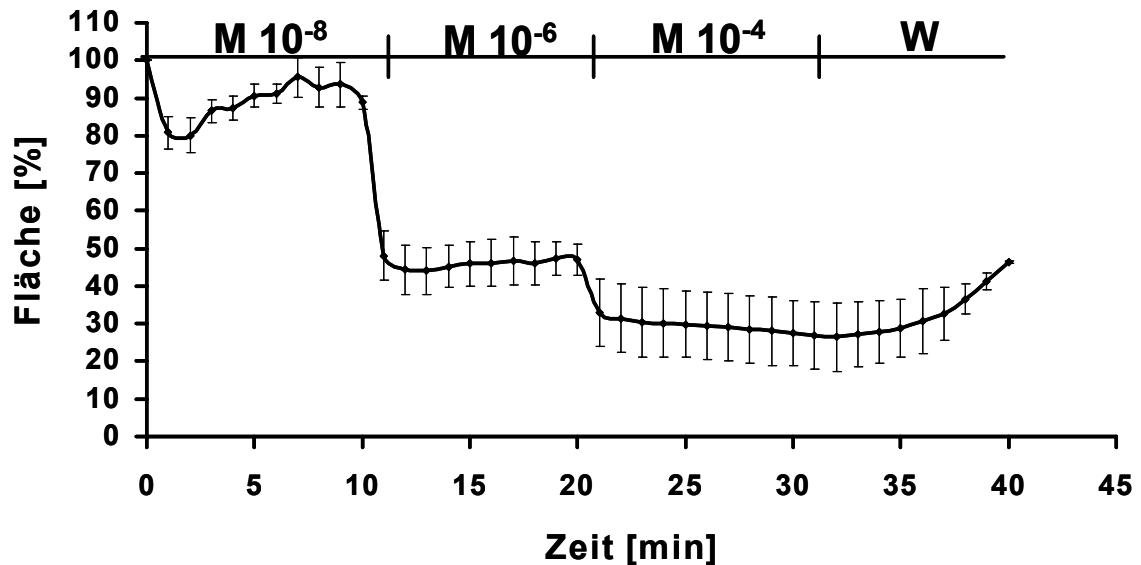


Abb. 7: Wirkung von unterschiedlichen Muskarinkonzentrationen auf den Flächeninhalt muriner Bronchioli (mittlerer Durchmesser Bronchioli $320 \pm 86 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=4$) und SEM. Applikation von Muskarin, wie im Exponent angegeben, jeweils zehn Minuten; Spülvorgang (W) der Inkubationszelle zehn Minuten.

4.1.2. Blockade der intrazellulären Kalziumspeicher

Um den Einfluss intrazellulärer Kalziumspeicher, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), auf die Konstriktion der Bronchioli zu beurteilen, wurde die pharmakologische Substanz Thapsigargin eingesetzt. Als Blocker der Kalzium-ATPase des glatten endoplasmatischen Retikulum entleert Thapsigargin Kalziumspeicher im ER und depletiert intrazelluläres Kalzium. Dafür wurden insgesamt zehn verschiedene Lungenschnitte ($n=10$) von sechs verschiedenen Tieren in Thapsigargin (10^{-5} M) enthaltendem Medium mindestens zwei Stunden vorinkubiert. Anschließend wurde in der Inkubationszelle in Anwesenheit von Thapsigargin (10^{-5} M) zu den Lungenschnitten Muskarin (10^{-4} M) appliziert (Abb. 8).

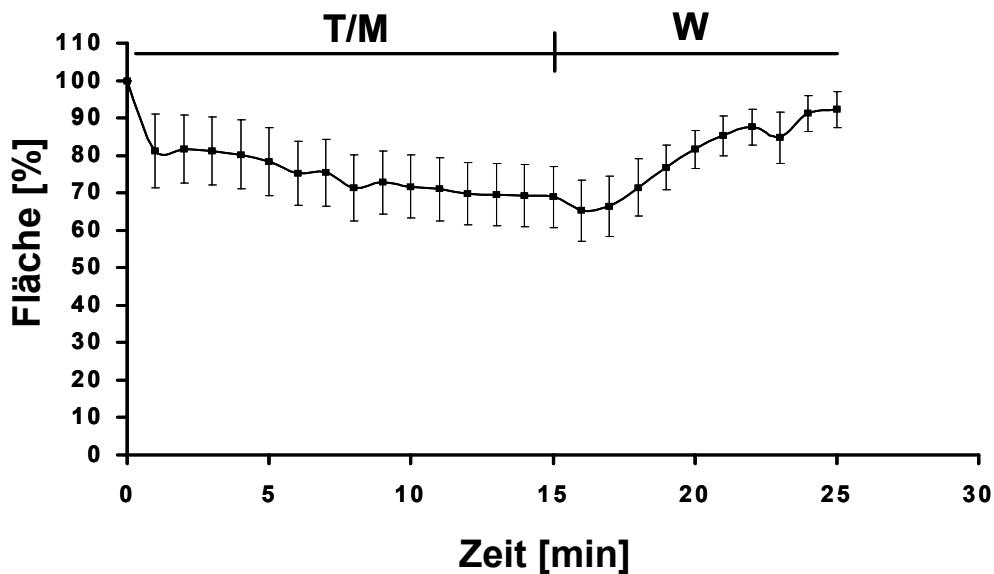


Abb. 8: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $215 \pm 27 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=10$) und SEM. Applikation von Muskarin 10^{-4} M in Anwesenheit von Thapsigargin 10^{-5} M (T/M) und Spülvorgang 15 Minuten (W).

Nach Vorinkubation mit Thapsigargin ist die Wirkung von Muskarin 10^{-4} M deutlich reduziert. Während Muskarin alleine bereits nach einer Minute eine Reduktion der Fläche der Bronchioli auf $53 \pm 9,9 \%$ bewirkt (Abb. 6), führt Muskarin in Anwesenheit von Thapsigargin maximal zu einer Reduktion der Fläche auf 80 % im Mittel.

3.1.3. Einfluss spannungsabhängiger Kalziumkanäle

Nachdem eine starke Abhängigkeit der Konstriktion von intrazellulären Kalziumspeichern demonstriert werden konnte, sollte als nächstes der Frage nachgegangen werden, inwieweit auch extrazelluläres Kalzium zu einer Beeinträchtigung der Bronchialweite führt. Um den Einfluss der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (VOCCs) auf die Kontraktionsfähigkeit der Bronchioli zu bewerten, wurde das Pharmakon Verapamil eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanalblocker. Verapamil wurde direkt in der Inkubationszelle, nach Überprüfung der Vitalität der Schnitte mit

Muskarin 10^{-4} M, in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Die Versuche wurden an insgesamt fünf verschiedenen Lungenschnitten ($n=5$) von vier Mäusen durchgeführt.

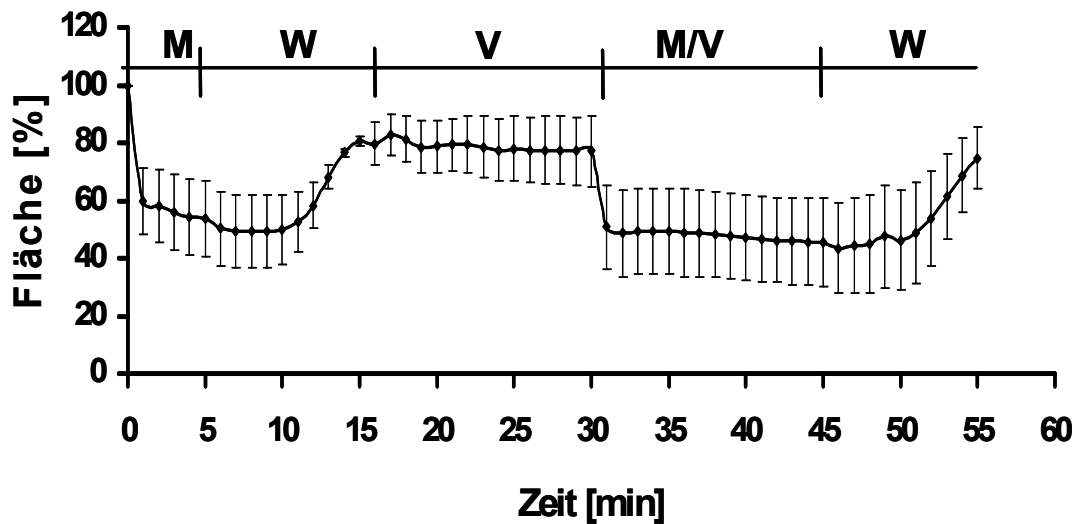


Abb. 9: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $285 \pm 40 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=5$) und SEM nach Applikation von Verapamil 10^{-5} M (V) und Muskarin 10^{-4} M mit Verapamil 10^{-5} M (M/V) und Spülvorgang (W).

Das Pharmakon Verapamil besitzt keinen Effekt auf die Bronchialweite. Wird Verapamil zusammen mit Muskarin angewandt, so beeinflusst die Anwesenheit des Blockers nicht die Reaktion auf Muskarin. Die starke Initialkonstriktion erfolgt unmittelbar und verstärkte sich leicht über 15 Minuten bis zum Waschvorgang (Abb. 9).

Um auszuschließen, dass die Bronchioli bei einer wiederholten Applikation von Muskarin verändert reagieren wurde eine Versuchsreihe mit gleichem Versuchsaufbau und der zweimaligen Gabe von Muskarin 10^{-4} M durchgeführt, um die Wirkung einer zweiten Muskarinapplikation zu untersuchen. Die Versuche wurden an insgesamt sechs verschiedenen Lungenschnitten ($n=6$) von fünf Mäusen durchgeführt.

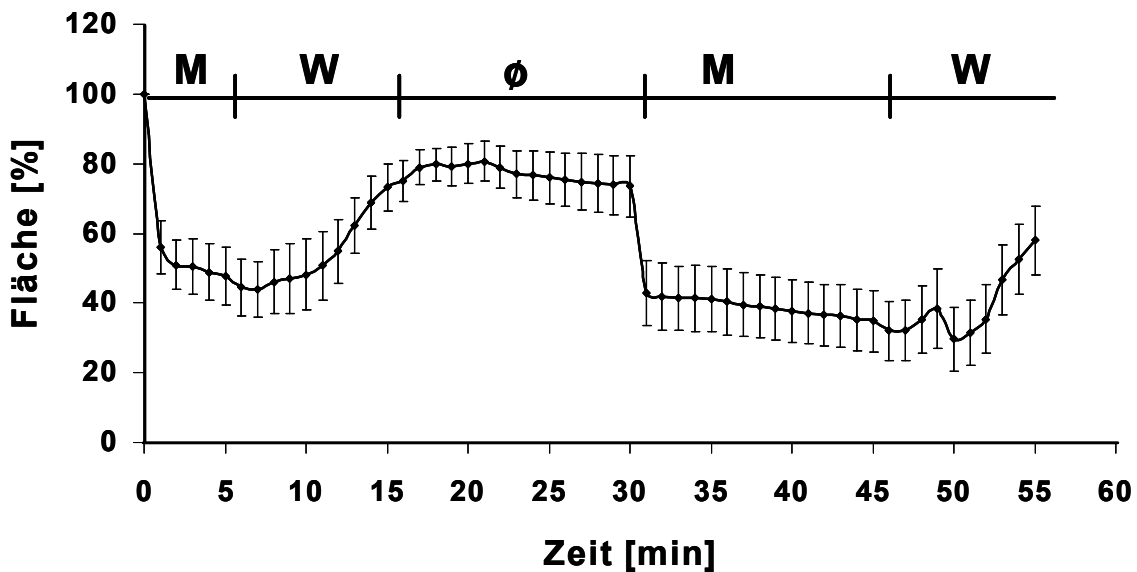


Abb. 10: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $250 \pm 19 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=6$) und SEM. Wiederholte Applikation von Muskarin 10^{-4} M (M) für 15 Minuten nach 15 minütiger Refraktärzeit (\emptyset) und Spülung der Inkubationszelle (W).

Die zweimalige Applikation von Muskarin führte bei murinen Lungenschnitten zu einer homologen Konstriktion der Bronchioli, gekennzeichnet durch eine starke initiale Konstriktion, die sich bis zum Spülvorgang leicht verstärkt (Abb. 10).

4.1.4. Einfluss spannungsunabhängiger Kalziumkanäle

Der Einfluss des extrazellulären Kalziumeinstroms durch spannungsunabhängige Kalziumkanäle (VICCs) auf die Konstriktion der Bronchioli wurde mit Hilfe der Substanz SKF 96365 ermittelt. Es handelt sich hierbei um einen Blocker spannungsunabhängiger Kalziumkanäle, der auch als TRPC-Kanalblocker beschrieben ist. SKF 96365 wurde direkt in der Inkubationszelle in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Zuvor wurde die Vitalität der Schnitte durch eine Applikation von Muskarin 10^{-4} M mit nachfolgender Spülung getestet. Die Versuche wurden an insgesamt sechs verschiedenen Lungenschnitten ($n=6$) von vier Mäusen durchgeführt.

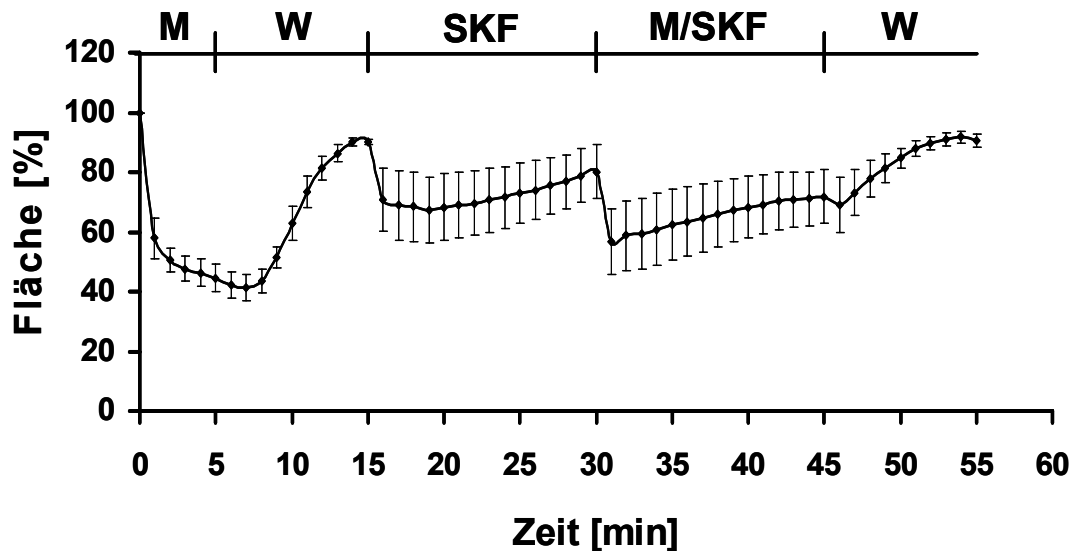


Abb. 11: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $255 \pm 37 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=6$) und SEM. Applikation von SKF 96365 10^{-5} M (SKF) und SKF 96365 10^{-5} M mit Muskarin 10^{-4} M (M/SKF).

Die ausschließliche Applikation von SKF 96365 10^{-5} M bewirkt eine transiente Verringerung des Flächeninhalts der Bronchioli um etwa 20 %. Wird dagegen SKF 96365 10^{-5} M zusammen mit Muskarin 10^{-4} M in die Inkubationszelle appliziert, führt dies zunächst zu einer initialen Reduktion der Bronchialweite, die in den folgenden 15 Minuten in Anwesenheit des Agonisten Muskarin um ungefähr 10 % nachlässt. Durch den Waschvorgang wird der Ausgangszustand wieder erreicht (Abb. 11).

4.1.5. Blockade von intra- und extrazellulären Kalziumspeichern

Um den Effekt nach Blockade intra- und extrazellulärer Kalziumquellen nachzuweisen wurden die Substanzen Thapsigargin und SKF 96365 gemeinsam eingesetzt. Dafür wurden insgesamt acht verschiedene Lungenschnitte ($n=8$) von drei Tieren zunächst zwei Stunden mit Thapsigargin 10^{-5} M inkubiert, um die intrazellulären Speicher zu entleeren. Anschließend wurde den Lungenschnitten in der Inkubationszelle in Anwesenheit von Thapsigargin 10^{-5} M SKF 96365 10^{-5} M für 15 Minuten zugeleitet. Das führte zu einer kontinuierlichen Erweiterung des mittleren Bronchialdurchmessers. Wurde anschließend ein Gemisch aus SKF 96365 und

Muskarin appliziert, so setzt eine initiale Muskarin-vermittelte Bronchokonstriktion ein, welcher eine Erweiterung der Bronchioli in Anwesenheit der Agonisten folgt (Abb. 12).

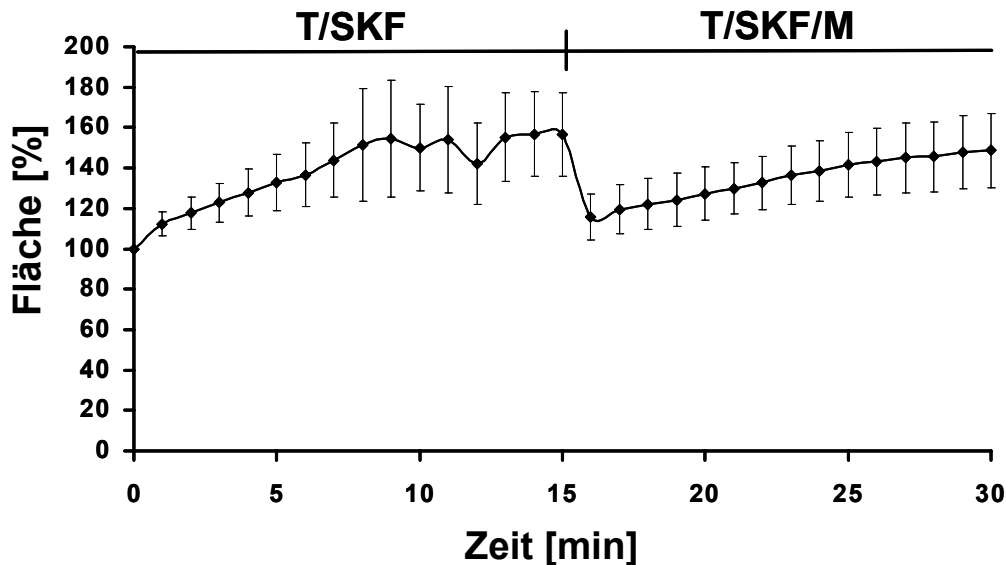


Abb. 12: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $250 \pm 38 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit nach Vorinkubation mit Thapsigargin 10^{-5} M (T). Dargestellt sind Mittelwerte ($n=8$) und SEM. Applikation von SKF 96365 10^{-5} M (T/SKF) bzw. SKF 96365 10^{-5} M und Muskarin 10^{-4} M (T/SKF/M) in die Thapsigargin 10^{-5} M enthaltende Inkubationskammer für 15 Minuten.

4.1.6. Beteiligung von TRPC-Kanälen

Der Effekt von OAG, einem Analogon von DAG, welches die Subfamilie der TRPC3/6/7-Kanäle aktiviert, wurde an insgesamt acht verschiedenen Lungenschnitten ($n=8$) von fünf Mäusen getestet. Die Substanz wurde direkt in der Inkubationszelle in einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt.

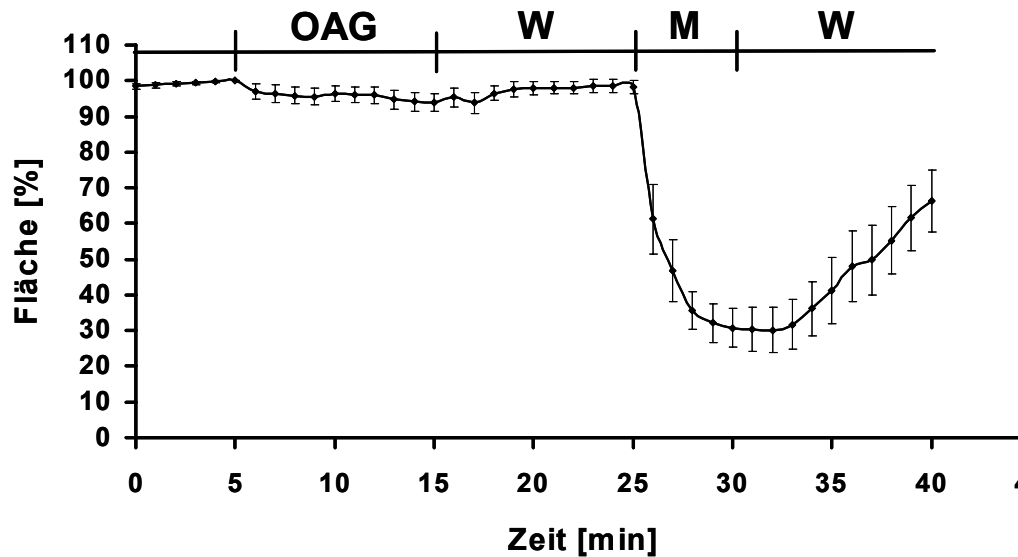


Abb. 13: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $210 \pm 12 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=8$) und SEM. Applikation von OAG 10^{-6} M (OAG) für zehn Minuten und Muskarin 10^{-4} M (M), Spülen der Inkubationszelle (W).

OAG 10^{-6} M führt zu einer geringen, aber signifikanten Verengung der Bronchioli von knapp 5 %. Die Kontrolle mit Muskarin 10^{-4} M wurde hier erst nachfolgend durchgeführt, da beim Einsatz von OAG nur eine geringe Konstriktion erwartet wurde und daher von einem vollkommen relaxiertem Bronchiolus ausgegangen werden sollte. Hier bewirkt Muskarin 10^{-4} M nachfolgend eine deutlich stärkere Konstriktion der Bronchioli von mehr als 70 % des mittleren Bronchiallumens, die über die gesamten fünf Minuten anhaltend verstärkt wird.

Um zu zeigen, dass der in Abb. 13 aufgezeigte Effekt des OAG auf eine Stimulation der TRPC-Kanäle zurückzuführen ist, wurde in den nachfolgenden Experimenten der Einfluss des TRPC-Kanal-Blockers SKF 96365 untersucht. Für die Versuche wurden insgesamt acht verschiedene Lungenschnitte ($n=8$) von drei Mäusen ausgewertet.

Dabei zeigt sich, dass nach der Gabe von SKF 96365 10^{-5} M und der gemeinsamen Applikation von SKF 96365 und OAG die Konstriktion der Bronchioli ausbleibt. Die nach der Spülung durch Muskarin 10^{-4} M induzierte Konstriktion zeigt den typischen Verlauf mit einer initialen Konstriktion, die in Anwesenheit von Muskarin weiter verstärkt wird (Abb. 14).

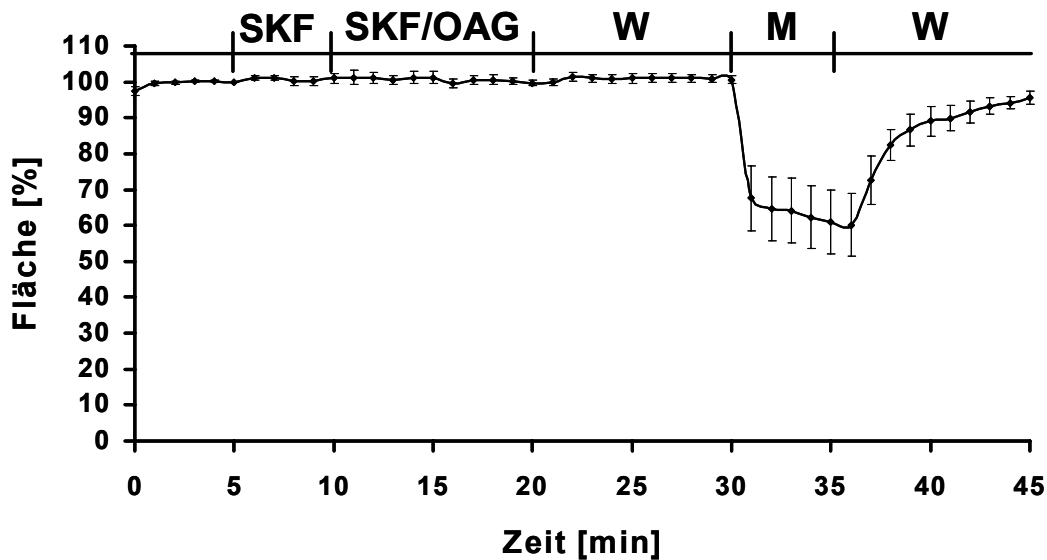


Abb. 14: Änderung des prozentualen Flächeninhalts (mittlerer Durchmesser Bronchioli $285 \pm 37 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=8$) und SEM. Applikation von SKF 96365 10^{-5} M (SKF) und SKF 96365 10^{-5} M zusammen mit OAG 10^{-6} M (SKF/OAG). Spülung der Inkubationszelle (W).

4.2. Expression von TRPC-Proteinen in der Mäuselunge

4.2.1. Nachweis der mRNS von TRPC-Proteinen in der Mäuselunge mittels reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion

In der Mäuselunge konnte die mRNS verschiedener Isoformen der TRPC-Kanalproteine mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Aus Mäusehirn gewonnene cDNS diente als Positivkontrolle. Die aus dem rechten cranialen Lungenlappen gewonnene Gesamt-RNS zeigte in der PCR Amplifikate übereinstimmend mit der mRNS von TRPC1 β , 1 γ , 1 δ , TRPC3, TRPC4 α , 4 β , TRPC5 and TRPC6 (Abb. 15). In der Mäuselunge waren die Isoformen TRPC1 β , 1 γ , 1 δ vertreten, wogegen im Mäusehirn mRNS von TRC1 α , 1 β , 1 δ amplifiziert wurde. Ein weiteres aus ca. 400 Basenpaaren bestehendes TRPC6 Amplifikat zeigte sich in der Mäuselunge. Dieses Produkt stimmt mit der mRNS der Basenpaare 1603-1936 von TRPC6 überein.

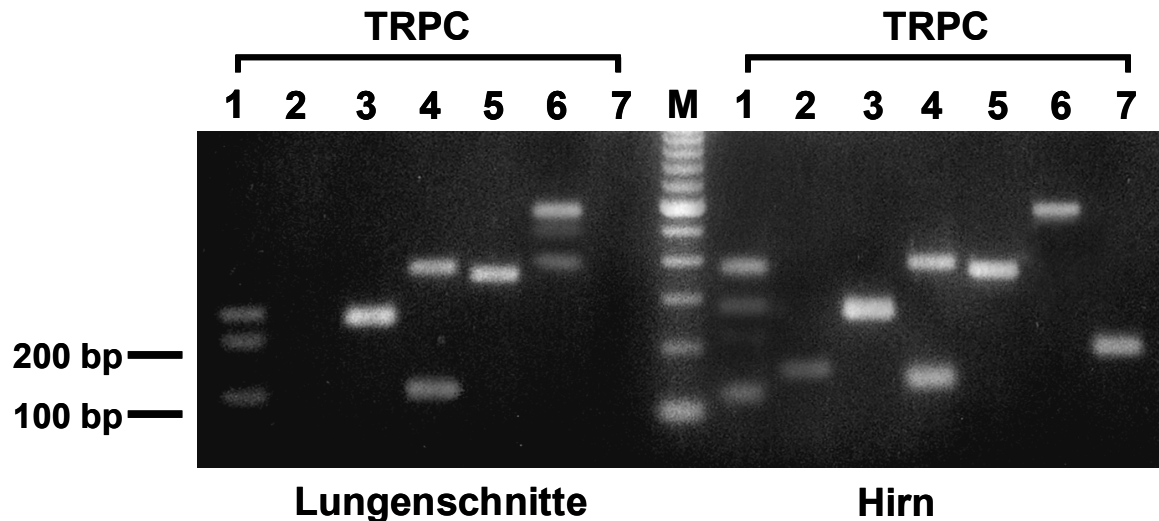


Abb. 15 Nachweis der TRPC-Proteine 1,3,4 und 6 in der Mäuselunge mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle diente cDNA des Mäusehirns.

4.2.2. Immunhistochemischer Nachweis von TRPC-Proteinen in der Lunge

Immunhistochemisch konnten die Proteine TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 in murinen Lungenschnitten nachgewiesen werden (Abb. 16). In Epithel- und glatten Muskelzellen war die Immunreaktivität sowohl intrazellulär als auch in der Membran zu finden. Die Doppelimmunfluoreszenz mit einem monoklonalen Antikörper für glatte Muskelzellen, α -smooth-muscle-actin, gab Aufschluss über die Lokalisation der TRPC-Proteine. Nur TRPC3 und TRPC6 waren in glatten Muskelzellen lokalisiert, nicht aber TRPC1 oder TRPC4. Die Immunreaktivität von TRPC1, TRPC3 und TRPC4 konnte in Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden, während dort keine Immunreaktivität für TRPC 6 gesehen werden konnte. Die Immunreaktivität war bei TRPC3 und TRPC4 auf die Zellmembran begrenzt, während sie bei TRPC1 intrazellulär anzutreffen war.

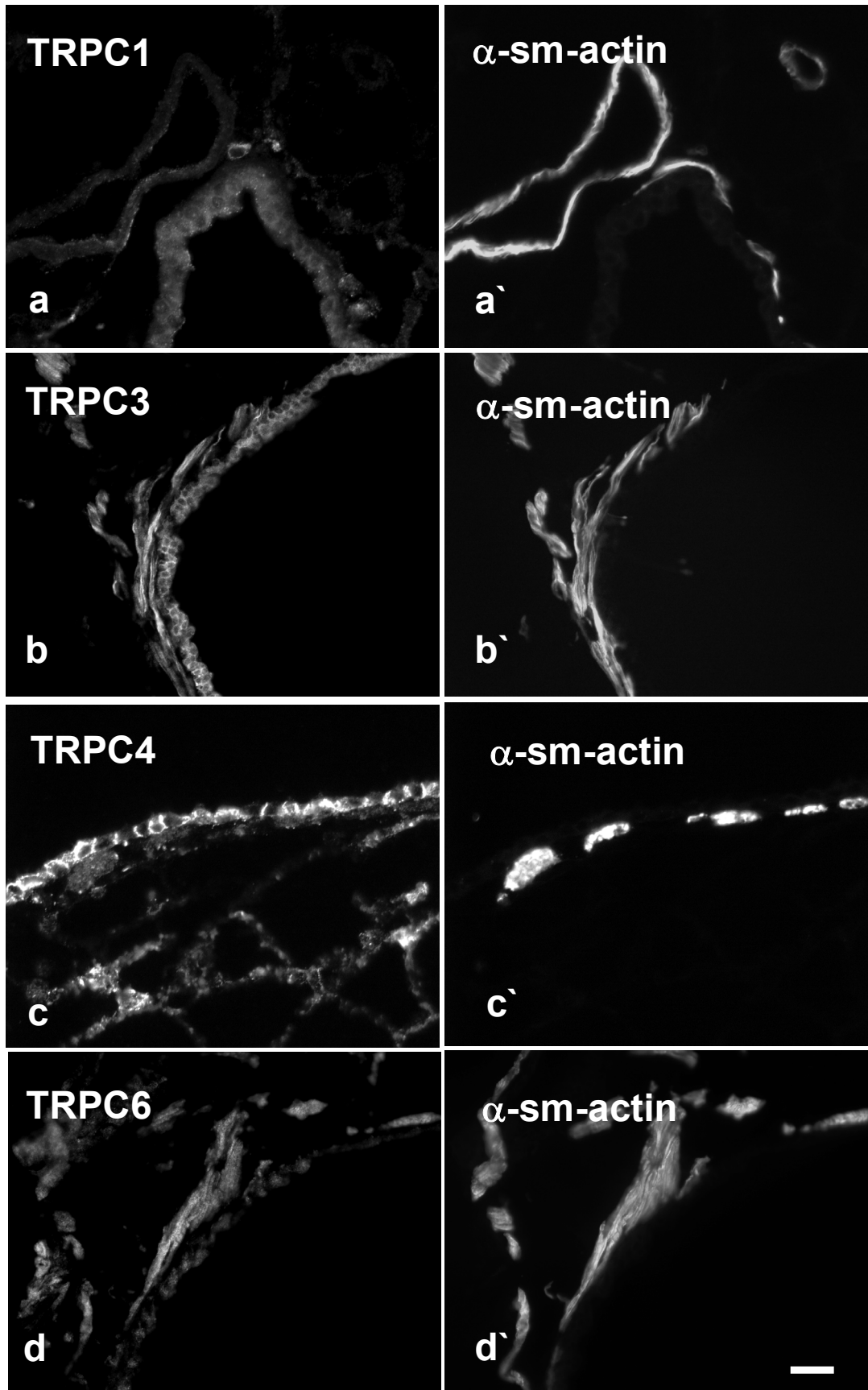


Abb. 15 Nachweis der TRPC-Proteine 1,3,4 und 6 (a-d) in der Mäuselunge mittels Doppelimmunfluoreszenz mit α -smooth-muscle-actin (a'-d')

5. Diskussion

Der von parasympathischen Nervenfasern freigesetzte Transmitter ACh ist der wichtigste neurogene Bronchokonstriktor. Bestimmten Erkrankungen der Atemwege wie Formen des *Asthma bronchiale* oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) liegen Dysregulationen der Atemwegswiderstände zugrunde, die mit einer gesteigerten cholinergen Aktivität, aber auch mit einer Hyperreaktivität auf eine mAChR-Stimulation in Verbindung gebracht werden (Zaagsma et al. 1997, Fryer & Jacoby 1998, Barnes 2001). Der Frage nach der mAChR-vermittelten Regulation des Atemwegswiderstandes der peripheren Atemwege kommt besondere Bedeutung zu, da diese Veränderungen zu einem erheblichen Teil vom Durchmesser der kleineren, peripheren Atemwege bestimmt werden (Martin 2002, Escolar et al. 2003). Eine Übertragung der Ergebnisse von Trachea und Hauptbronchien auf kleine, periphere Bronchien ist nicht ohne weiteres möglich, da die peripheren Atemwege im Vergleich zu den großen luftleitenden Strukturen Unterschiede im histologischen Aufbau, der Innervation und der mAChR-Verteilung aufweisen (Pack et al. 1981, Junqueira 1986, Fryer & el-Fakahany 1990, Wessler et al. 1998, Wessler & Kirkpatrick 2001). Diese Unterschiede sind auch in Bezug auf die Wirkweise bronchoreaktiver Substanzen und Pharmaka zu beobachten. So wurde beispielsweise bei der Ratte in kleineren Bronchioli im Vergleich zu den großen Bronchien eine zehnfach stärkere Reaktion auf das bronchokonstriktorische Thromboxanalogon U46619 beobachtet (Martin et al. 2000) und auch auf das ACh-Analogon Methacholin reagieren die kleinen Bronchioli der Ratte sensibler als die großen Bronchien (Martin et al. 1996). Dieser unterschiedliche konstriktorische Effekt auf verschiedene Atemwegskaliber wurde auch an anderen Spezies und anderen Systemen durch Substanzen wie ACh oder Metacholin belegt (Shioya et al. 1987, Mitchell & Sparrow 1994, Gray & Mitchell 1996). Diese Studien zeigen neben der erhöhten Sensitivität für Konstriktoren mit abnehmenden Atemwegskaliber auch eine Abnahme der Reaktionszeit. Die Erklärungsansätze für diese Beobachtung sind sehr vielseitig: Die zentralen Atemwege könnten andere Rezeptoren oder eine geringere Rezeptorendichte als die peripheren aufweisen, es könnten zentral größere Mengen bronchodilatatorischer Substanzen freigesetzt werden, das Verhältnis der glatten Muskulatur zur Größe des Bronchiallumens könnte eine Rolle spielen, oder Unterschiede in der Dicke des

Epithels zwischen den peripheren und zentralen Atemwegen könnten die Ursache für unterschiedliche Durchlässigkeiten für Substanzen sein (Martin et al. 1996, Martin et al. 2000). Es wäre aber auch denkbar, dass große Atemwege aufgrund ihrer knorpeligen Anteile starrer sind und daher eine geringere Konstriktion zeigen.

Im Gegensatz zu reinen *in vitro*-Ansätzen wurde für diese Arbeit die Methodik der Videomorphometrie angewandt, die aufgrund ihrer *ex vivo*-Technik auch die längerfristige Analyse pulmonaler Reaktivität im organnahen Modell ermöglicht. Vitale Schnittpräparationen der Lunge haben sich bereits als wichtiges Modell in der Pharmakologie und Toxikologie bewährt. Die Technik wurde erstmals von Krumdiek und Ho (Krumdiek & Ho 1980) beschrieben. Sie ermöglicht es, an homogenen Schnittpräparation der Lunge, die auch nach einigen Tagen in Zellkulturmedium ihre Vitalität beibehalten, morphometrische Untersuchungen von Gefäß- und Atemwegskalibern durchzuführen. Gegenüber Zellkulturen bestehen hier die Vorteile eines intakten Gewebeverbandes, dessen einzelne zelluläre Komponenten nach wie vor miteinander wechselwirken können. Ferner sprechen Argumente, wie Tierschutzfreundlichkeit, Ökonomie und Gleichförmigkeit der Schnitte für diese Methodik. Durch die hohe Ausbeute an Schnittpräparaten pro Tier kann die für die Versuche benötigte Tieranzahl wertvoller transgener knock-out-Mutanten gering gehalten werden. Hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das vitale Organ wurden von Held et al. isoliert perfundierte sowie ventilierte Mäuselungen und Schnittpräparationen der Lunge untersucht und vergleichbare Reaktivitäten der pharmakologischen Substanzen Methacholin und U46619 nachgewiesen (Held et al. 1999). Die externe Begasung der Lungenschnitte unmittelbar nach ihrer Herstellung bei 37 °C in einem Inkubationsschrank mit einem der Umgebungsluft entsprechenden Gasgemisch stellt eine wesentliche Verbesserung gegenüber den bisher beschriebenen Methoden (Krumdiek & Ho 1980, Dandurand et al. 1993, Martin et al. 1996, Held et al. 1999) dar. Sie gewährleistet ein schnelleres Auswaschen der Agarose aus den Atemwegen, so dass die Schnitte schon nach zwei bis drei Stunden für die Versuche genutzt werden können. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse resultieren aus Experimenten mit maximal 24 Stunden alten Schnittpräparationen, obwohl diese auch noch nach zwei bis drei Tagen aufgrund von Zilienschlag und Konstriktionen als vital beschrieben werden könnten. Vorversuche zeigten jedoch, dass mit steigendem Alter der Bronchialanschnitte die

durch Muskarin ausgelöste Konstriktion zunimmt. Eine ähnliche Beobachtung wurde an Muskelringpräparationen des Schwanzes und der Basilararterie der Ratte nach drei- bis viertägiger Kultur in serumfreien Medium gemacht, bei der die intrazelluläre Kalziumfreisetzung nach Coffein-Stimulation gegenüber frischen Präparationen zwei bis vierfach erhöht war (Dreja et al. 2001). Auf den Zusatz von Insulin, Kortison oder Vitamin A zum Inkubationsmedium (Dandurand et al. 1993) wurde bewusst verzichtet, da eine Notwendigkeit dieser Zusätze für das hier verwendete Einsatzgebiet durch Vorversuche ausgeschlossen werden konnte, und die Konstriktion der Bronchien beim Zusatz von Glukokortikoiden nur noch unvollständig stattfindet (Martin et al. 1996). Dieser Effekt beruht möglicherweise darauf, dass Glukokortikoide die Phospholipase A₂ unspezifisch hemmen, die auch in der Signalkaskade der mAChR eine Rolle spielen könnte. Auf den Zusatz von Phenolrot als pH-Indikator des Inkubationsmediums wurde dagegen nicht verzichtet, obwohl auch diese Substanz über eine Hemmung des Thromboxan-Prostanoidrezeptors einen Einfluss auf transmembranäre Signalkaskaden nehmen soll (Greenberg et al. 1994). Jedoch war für die Versuche dieser Arbeit die Signalkaskade nach mAChR-Stimulation von Relevanz, und die durchgeführten Versuche mit der Kontrollsubstanz U46619 (Abb. 6) deckten sich trotz Phenolrotzusatzes mit vergleichbaren Studien in der Literatur (Martin et al. 1996). Dies könnte auf die schnellere Verfügbarkeit der Schnitte durch die Begasung zurückzuführen sein.

Beim Menschen werden die Bronchioli definitionsgemäß als knorpelfreie Anteile des luftleitenden Systems verstanden, die einen Durchmesser von weniger als zwei Millimetern aufweisen (Macklem 1998). In der Lunge der Maus sind nahezu alle luftleitenden Abschnitte knorpelfrei und der einzige noch Knorpel enthaltende linke Stammbronchus weist einen Durchmesser von etwa einem Millimeter auf (Valerius 1996). Die bei der Maus im gesamten Atemwegsepithel dominierenden Clarazellen sind beim Menschen im einschichtigen Epithel der Bronchioli ebenfalls vorherrschend (Plopper et al. 1983). Demnach wären alle darauf folgenden luftleitenden Strukturen der Lunge der Maus hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung der Atemwegswand mit den Verhältnissen in Bronchioli des Mensch vergleichbar.

Für diese Arbeit wurden Schnittserien ausgewählt, die neben einem intakten Gewebeverband einen Durchmesser von 100-400 µm aufwiesen. Grundsätzlich wurde zur Überprüfung der Vitalität des Schnittes eine Stimulation der mAChR durch

Muskarinzugabe durchgeführt, sodass nur solche Schnitte zur Auswertung gelangten, die eine Muskarin-abhängige Konstriktion zeigten. In die Inkubationszelle zugesetztes Muskarin verursachte in peripheren Atemwegen eine starke und schnelle initiale Konstriktion. Diese Konstriktion blieb in Anwesenheit des Agonisten bis zu einer Spülung des Systems erhalten und war im Ausmaß von der eingesetzten Muskarinkonzentration abhängig. Zur maximalen Stimulation der mAChR wurde nach Austestung verschiedener Muskarinkonzentrationen schließlich mit einer Konzentration von 10^{-4} M gearbeitet, bei der sich die luminale Weite der Atemwege initial bis auf durchschnittlich 30 % des Ausgangswertes verkleinerte. Dieser Wert ist mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar, die die Konstriktion durch den mAChR-Agonisten Metacholin erzielten (Martin et al. 1996). Die Reaktivität der peripheren Atemwege unterscheidet sich durch Stärke und Geschwindigkeit des Wirkeintritts von vergleichbaren Reaktionen der zentralen Atemwege. Der schneller einsetzende und stärkere konstriktorische Effekt bei Atemwegen mit geringerem Durchmesser deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur (Shioya et al. 1987, Mitchell & Sparrow 1994, Gray & Mitchell 1996).

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern sich die Reaktionen der peripheren Atemwege nach mAChR-Stimulation von den zentralen Strukturen unterscheiden. Ferner sollte ermittelt werden, welche Signaltransduktionswege der Konstriktion peripherer Atemwege zugrunde liegen. Von der Konstriktion der glatten Muskulatur von Trachea und Stammbronchien ist bekannt, dass sie hinsichtlich der mAChR-Subtypen mAChR3 vermittelt ist, obwohl dort auch der mAChR2 nachgewiesen wurde (Roffel et al. 1990, Halayko et al. 1999, Stengel et al. 2000, Stengel et al. 2002). Nach Stimulation des Rezeptors wird PLC- und IP_3 -abhängig Kalzium über eine Entspeicherung des endoplasmatischen Retikulums intrazellulär freigesetzt und löst eine Konstriktion glatter Muskelzellen aus. Ferner ist ein Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum sowohl über spannungsabhängige als auch über spannungsunabhängige Kalziumkanäle beschrieben worden, der für die Aufrechterhaltung der Konstriktion nach einer Erschöpfung der intrazellulären Speicher erforderlich ist (McDaniel et al. 2001, McFadzean & Gibson 2002). Auch aus den peripheren Atemwegen gibt es Hinweise, dass die Vermittlung der Konstriktion nach ACh-Gabe mAChR3-vermittelt ist (Roffel et al. 1990). Die Tatsache, dass die für diese Arbeit verwendeten Schnittpräparationen der peripheren

Atemwege sich als stark Muskarin-sensitiv erwiesen, weist auf einen mAChR3 vermittelten Signaltransduktionsweg vergleichbar mit den zentralen Atemwegen hin. Hinsichtlich der Vermittlung der Konstriktion nach mAChR3-Stimulation war von Interesse, aus welcher Quelle das für die Konstriktion verantwortliche Kalzium stammt. Hierfür wurden zunächst exemplarisch die intrazellulären Kalziumspeicher der Zellen entleert. Der zur kontinuierlichen Speicherentleerung genutzte Wirkstoff Thapsigargin ist ein Blocker der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen-Retikulums (SERCA). Nach zweistündiger Inkubation der Lungenpräparationen mit Thapsigargin entsprach die initiale Konstriktion der Bronchioli mit 20 % nur etwa einem Drittel der gewohnten Konstriktion nach mAChR-Stimulation ohne SERCA-Blockade. Die Konstriktion blieb über den gesamten Zeitraum der Anwesenheit von Muskarin erhalten und nach Ausspülen war der Effekt nicht mehr vorhanden (Abb. 8). Die Tatsache, dass trotz der Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher immer noch eine Reaktion der Bronchioli auf Muskarin vorhanden war, legt den Schluss einer Beteiligung extrazellulären Kalziums an der Konstriktion nahe. Aus den zentralen Atemwegen ist für die glattmuskuläre Konstriktion nach mAChR3-Stimulation eine Bereitstellung von Kalzium über den Einstrom sowohl spannungsabhängiger als auch spannungsunabhängiger Ionenkanäle beschrieben worden (McDaniel et al. 2001, McFadzean & Gibson 2002). Der AChR-vermittelte Einstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle (VOCCs) spielt in exzitatorischen Zellen wie Nerven- und Muskelzellen die Hauptrolle. Dabei wird das Öffnen der Kanäle durch eine Änderung des Membranpotentials (Depolarisation) ausgelöst. Für die Bronchialmuskulatur sind VOCCs des L-Typs beschrieben (Janssen 1996), und sie werden in den zentralen Atemwegen hauptsächlich für den die Konstriktion aufrecht erhaltenden Kalziumeinstrom verantwortlich gemacht (Chapman et al. 1988, Cuthbert et al. 1994, Corompt et al. 1998). Zur Überprüfung einer Beteiligung dieser Kanäle an der Konstriktion peripherer Atemwege wurde – wie in Arbeiten an den zentralen Atemwegen – das Pharmakon Verapamil als spezifischer L-Typ-VOCC-Blocker eingesetzt. Diese Blockade vermochte jedoch keine signifikante Abweichung vom Konstriktionsverlauf nach herkömmlicher mAChR-Stimulation zu induzieren, weshalb eine Beteiligung spannungsabhängiger Kanäle des L-Typs an der Konstriktion peripherer Atemwege ausgeschlossen werden kann (Abb. 9). Dies stellt einen Unterschied zu den zentralen Atemwegen dar, wo mehrfach ein Verapamil-sensitiver Effekt der Konstriktion beschrieben wurde (Chapman et al. 1988, Cuthbert

et al. 1994, Corompt et al. 1998). Nach Inhalation von Verapamil wurde auch bereits gezeigt, dass der antagonistische bronchodilatatorische Effekt hauptsächlich in den großen und weniger in den kleinen Atemwegen auftritt (Popa et al. 1984). Auch diese Beobachtung unterstreicht, dass die Konstriktion peripherer Atemwege nicht, oder nur geringfügig über L-Typ VOCCs vermittelt ist.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte eine Beteiligung der L-Typ VOCCs an der Konstriktion peripherer Atemwege weitestgehend ausgeschlossen werden. In weiteren Experimenten wurden die spannungsunabhängigen Kalziumkanäle (VICCs) näher untersucht. Die für diese Zwecke eingesetzte Substanz SKF 96365 (SKF) ist als Blocker der VICCs bekannt (Ito et al. 2004, Van Geldre & Lefebvre 2004) und verhindert einen Rezeptor-vermittelten (Yakubu & Leffler 2002) bzw. einen Speicher-abhängigen (McCarron et al. 2002, Carraway et al. 2003, Denys et al. 2004) Kalziumeinstrom in die Zelle. Die initiale Konstriktion der Bronchioli nach Zugabe von SKF (Abb. 10) kann durch eine anfängliche Aktivierung der nachfolgend blockierten Kanäle (partiell agonistischer Effekt) erklärt werden. Ein solcher Effekt ist bei vielen antagonistisch wirkenden Pharmaka beschrieben. In Anwesenheit von SKF blieb die deutliche und initiale Konstriktion der Bronchioli auf Muskarin bestehen, in der folgenden Einwirkungszeit nahm die Konstriktion aber trotz Anwesenheit des Agonisten kontinuierlich und statistisch signifikant ab (Abb. 10). Der korrespondierende Versuch in Abwesenheit von SKF demonstrierte dagegen eine anhaltende und kontinuierlich steigende Konstriktion in Anwesenheit von Muskarin (Abb. 11). Die Versuche mit einem VICC-Blocker zeigten, dass auch in den peripheren Atemwegen der Kalziumeinstrom von extrazellulär für die Aufrechterhaltung der Konstriktion nach mAChR-Stimulation verantwortlich zu sein scheint, da nach deren Blockade die Konstriktion nicht in gleichem Maße aufrechterhalten werden kann. Da die initiale Konstriktion nicht SKF-sensitiv ist, scheint diese nahezu unabhängig von einem extrazellulären Kalziumeinstrom zu sein. Die Tatsache, dass die Kalziumkanäle nur durch SKF und nicht durch Verapamil blockierbar sind weist darauf hin, dass in den peripheren Atemwegen der Kalziumeinstrom hauptsächlich über die VICCs erfolgt.

Als Vertreter der VICCs sind die TRPC-Kanalproteine TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 als mögliche Kalziumkanäle von besonderem Interesse, denn die

entsprechende mRNA dieser Membranproteine konnten bereits in der Lunge des Menschen nachgewiesen werden (Corteling et al. 2003). Auch wir konnten die mRNA dieser Kanalproteine mittels RT-PCR-Experimenten in der Mäuselunge nachweisen (Abb. 15). Dabei fiel auf, dass TRPC7-Genomäquivalente nicht detektierbar waren, obwohl das entsprechende Protein bei Mäusen vorkommen soll (Okada et al. 1999). Möglicherweise spielen dafür Zuchtlinien-spezifische Unterschiede im Kanalrepertoire eine Rolle. Neben dem Nachweis auf Genomebene konnten die TRPC-Proteine auch immunhistochemisch in den peripheren Atemwegen der Maus detektiert werden (Abb. 16). Mittels doppelimmunhistochemischer Untersuchungen konnten die Proteine TRPC3 und TRPC6 gemeinsam auf glatten Muskelzellen lokalisiert werden, während TRPC1 und TRPC4, sowie TRPC3 auf Bronchialepithelzellen nachgewiesen wurde. Das gemeinsame Vorkommen von TRPC3 und TRPC6 auf glatten Muskelzellen peripherer Atemwege ist nicht verwunderlich, handelt es sich doch hierbei um Proteine, die strukturell und funktionell einer Gruppe angehören und Heteromultimere bilden können (Gudermann et al. 2004).

Der Aktivierungsmechanismus, der dieser Untergruppe der TRPC-Kanäle (TRPC3, TRPC6 und TRPC7) zugrunde liegt, ist G-Protein gekoppelt und wurde bisher nur an transfizierten Zelllinien (Ma et al. 2001, Zhang & Saffen 2001, Venkatachalam et al. 2001, Tesfai et al. 2001, Jung et al. 2002) oder TRPC6-defizienten Mäusen (Freichel et al. 2004) untersucht. Dabei wird dem intrazellulären Phospholipidmetaboliten DAG eine Schlüsselrolle für die Aktivierung zugeschrieben (Hofmann et al. 1999, Zhang & Saffen 2001, Riccio et al. 2002, Gudermann et al. 2004). Aus diesem Grund wurde für die videomorphometrischen Untersuchungen das DAG-Analogon Oleoylacetylglycerol (OAG) eingesetzt. Die Applikation von OAG löste mit etwa fünf Prozent nur eine schwache Konstriktion aus (Abb. 13). Die konstriktorische Wirkung von OAG fällt erwartungsgemäß sehr gering aus, da extrazelluläres Kalzium nach den bereits diskutierten Ergebnissen v. a. für die Aufrechterhaltung der anhaltenden Konstriktion nach mAChR-Stimulation verantwortlich ist. Die initiale starke Konstriktion fehlt, da die Freisetzung des intrazellulären Kalziums aus dem ER nach Stimulation mit OAG ausbleibt. Die in Anwesenheit von SKF ausbleibende Konstriktion auf OAG legt den Schluss nahe, dass die OAG-sensiblen Kalziumkanäle für einen Einstrom von extrazellulär durch SKF blockiert sind (Abb. 14). Dies beweist,

dass OAG auf von SKF inhibierbare Kanäle wirkt, was für das Vorkommen von TRPC3 und TRPC6 in der peripheren Lunge der Maus spricht.

Neben dem direkten konstriktorischem Effekt steigert OAG trotz des Auswaschens signifikant die nachfolgende Konstriktion auf Muskarin, wobei es zu einer Verringerung der luminalen Fläche von deutlich mehr als 70 % des ursprünglichen Atemwegsdurchmessers kommt (Abb. 13). Im Gegensatz dazu fällt die Konstriktion durch Muskarin unter dem Einfluss des OAG und SKF-Blockade mit einer Konstriktion der Fläche von 40 % des Ausgangswerts deutlich geringer aus (Abb. 14). Eine mögliche Erklärung für die nach der OAG aufgetretene, gesteigerte Konstriktion auf Muskarin könnte die Stimulation der PKC, oder die Synthese von Thromboxan A_2 sein. Für die Aktivierung von PKC ist bekannt, dass sie durch DAG stimuliert wird und so könnte dieses Enzym gleichermaßen durch OAG aktiviert worden sein. PKC könnte ebenfalls die MLC_{20} phosphorylieren und somit zu einer gesteigerten Konstriktion des glatten Muskels führen (Abdel-Latif 2001). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen belegen ebenfalls eine gesteigerte Kalziumsensibilität glatter Muskelzellen des Kolons (Sato et al. 1994), von Gefäßen (Itoh et al. 1994) und der Trachea (Park & Rasmussen 1985, Takuwa et al. 1987) nach Aktivierung der PKC. Die gesteigerte Sensibilität wird jedoch kontrovers diskutiert und konnte in anderen Arbeiten widerlegt werden. So konnten andere Autoren durch den Einsatz von PKC-Blockern die gesteigerte Sensibilität der glatten Muskelzellen der Atemwege nicht inhibieren (Bremerich et al. 1997, Bazan-Perkins et al. 1998) und auch der Einsatz von OAG konnte die Sensibilität der Muskelzellen für Kalzium nicht erhöhen (Bremerich et al. 1997). Auch für die Aktivierung der Synthese von Thromboxan A_2 durch PLA_2 werden die intrazellulären Botenstoffe DAG und PKC diskutiert (Brooks et al. 1989, Felder et al. 1990). Eine gesteigerte Konstriktion auf ACh im Zusammenhang mit Thromboxan A_2 wird für Bronchialmuskelpreparationen, die noch Bronchialepithel enthalten, beschrieben (Strek et al. 1992). Da die gesteigerte Konstriktion auf Muskarinapplikation aber in Anwesenheit von SKF unterdrückt ist, scheint vielmehr auch diesem Effekt eine Beteiligung der TRPC-Kanäle zugrunde zu liegen. Vielleicht vermag die PKC über die Phosphorylierung von Membranproteinen, die Membraneigenschaften im Sinne einer erhöhten Durchlässigkeit für Kalzium ändern. Der exakte Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht restlos geklärt werden und muss daher weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur die spezifische Beteiligung der nachgewiesenen TRPC-Proteine an der anhaltenden Konstriktion glatter Muskelzellen in den peripheren Atemwegen, sondern sie belegen auch erstmals eine DAG-abhängige Aktivierung in einem organnahen Lungenmodell. Neben den DAG-abhängigen Kanälen bestehen offensichtlich zusätzlich weitere Mechanismen, die auch im peripheren System die Weite der Atemwege regulieren. Da sich anhand der immunhistochemischen Untersuchungen keine Evidenzen für weitere TRPC-Proteine auf glatten Muskelzellen ergaben, scheint der Einfluss einer erweiterten Kontraktilität der peripheren Atemwege zusätzlich durch Faktoren bestimmt zu werden, die aus einem Zusammenspiel glatter Muskelzellen mit anderen Zellverbänden resultieren. Als Kandidaten für solche Effekte könnten die Epithelzellen angesehen werden, bei denen ebenfalls TRPC3-, aber auch DAG-unabhängige TRPC1- und TRPC4-Proteine vorkommen. Von Trachealepithelzellen ist eine Signalkaskade nach mAChR-Stimulation, die zur gesteigerten Bildung von Stickoxid (NO) führt, bekannt (Takahashi et al. 2000). Das gebildete NO wirkt relaxierend auf die Atemwegsweite. Videomorphometrisch wird der sich aus Konstriktion und Relaxation ableitende Nettoeffekt des Gesamtsystems bestimmt, der sich von dem allein auf glatte Muskelzellen wirkenden Effekt unterscheiden könnte. Bei der Konstriktion der Trachea des Rindes führten spasmogene Stimuli bei Fehlen des Atemwegsepithels zu einer verstärkten Konstriktion (Spicuzza et al. 2002).

Insbesondere könnte auch von bislang nicht charakterisierte Regulationen über TRPC1- und TRPC4-Proteine auf Trachealepithelzellen ein Effekt ausgehen. Ferner erscheint ein von verbliebenen Alveolarmakrophagen ausgehender Effekt möglich, durch den der Atemwegskaliber beeinflusst werden kann. Von diesen Zellen produzierte Chemokine wie z. B. TNF- α , einem Mediator für den zumindest ein vasodilatatorischer Effekt beschrieben ist (Janeway & Travers 1997), könnten einen Einfluss auf den Bronchialdurchmesser nehmen, wurden aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf die wichtige Rolle der TRPC-Kanalproteine in der Kontrolle peripherer Atemwege hin. Die Integration der TRPC-Kanal-Aktivierung in die Signalkaskade der mAChR zeigt – unter Kenntnis des Einflusses

mAChR in der Pathologie obstruktiver Lungenerkrankungen – die Proteine als ein Zielgebiet pharmakologischer Interventionen auf.

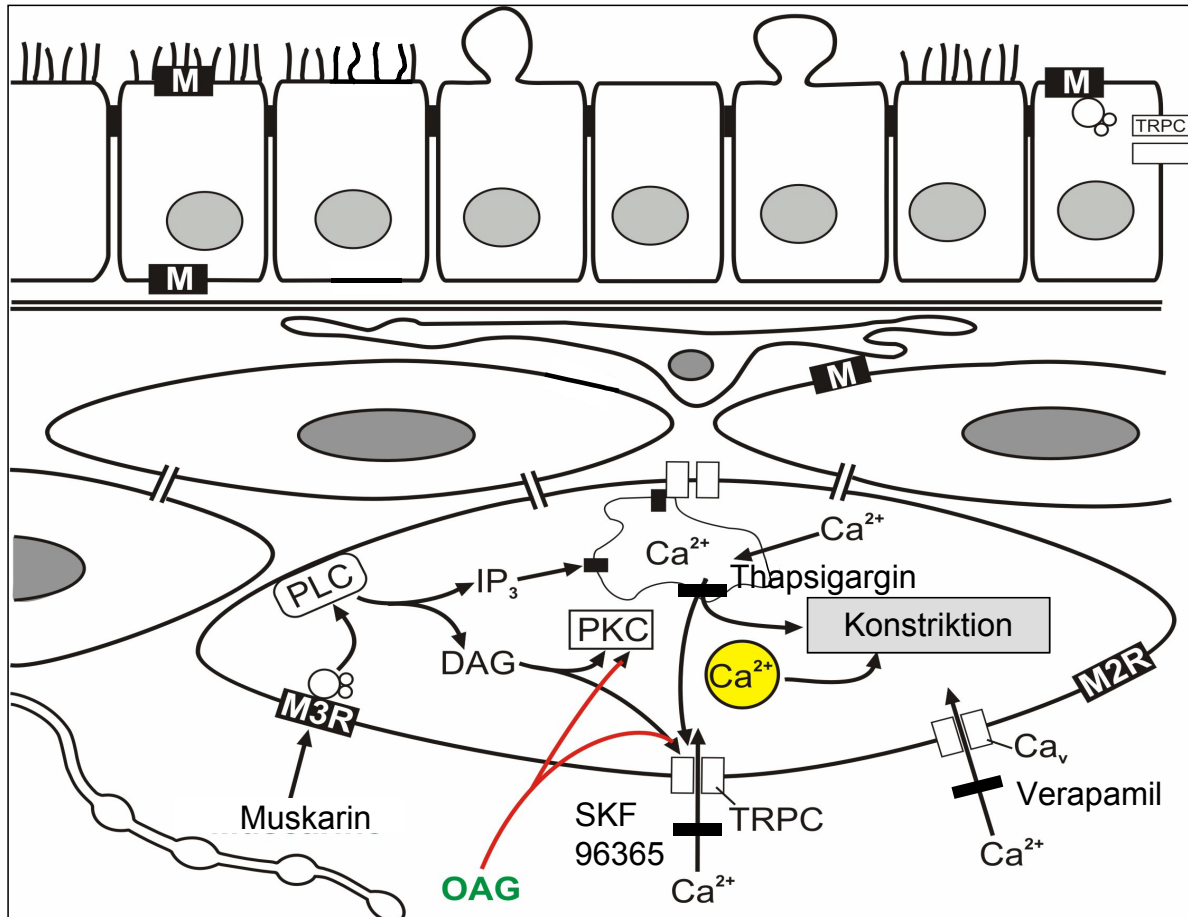


Abb. 16: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege der Konstriktion in einer glatten Muskelzelle der peripheren Atemwege nach mAChR3-Stimulation. Dargestellt sind ferner die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Blocker mit Angriffspunkten.

6. Zusammenfassung

Der wichtigste neurogene Bronchokonstriktor Acetylcholin (ACh) reagiert in der Lunge mit Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR), die auf glatten Muskelzellen und Epithelzellen lokalisiert sind. Bislang lagen v. a. Erkenntnisse über den Effekt und die Signaltransduktionswege nach mAChR-Stimulation an zentralen Atemwegen wie Trachea und Stammbronchien vor. Wegen ihrer besonderen Bedeutung bei der Pathogenese obstruktiver Lungenerkrankungen wurden in dieser Arbeit die für den Atemwegswiderstand wichtigeren peripheren Atemwege näher untersucht.

Anhand von vitalen Schnittpräparationen von Lungen konnten mAChR-Subtypen peripherer Atemwege funktionell nachgewiesen werden. Die Muskarin-vermittelte Konstriktion peripherer Atemwege war durch eine schnelle und starke initiale Konstriktion gekennzeichnet, die über die gesamte Zeit der Anwesenheit des Agonisten andauernd war. Die nähere Untersuchung der beteiligten Signalwege ergab, dass das für die Konstriktion erforderliche Kalzium initial aus intrazellulären Kalziumressourcen stammt. Zur Aufrechterhaltung der Konstriktion bedarf es – wie in zentralen Atemwegen – des Einstroms von Kalzium aus dem Extrazellulärraum. In weiteren Untersuchungen wurden die für den Kalziumeinstrom verantwortlichen Kanäle peripherer Atemwege näher untersucht. Eine Beteiligung von spezifischen spannungsabhängigen Kalziumkanälen (VOCCs) konnte mit Hilfe des Agonisten Verapamil ausgeschlossen werden. Dagegen erwiesen sich eine Gruppe von spannungsunabhängigen Kalziumkanälen (VICCs), die TRPC-Kanalproteine, als aussichtsreiche Kandidaten für den Kalziumeinstrom in die glatten Muskelzellen peripherer Atemwege. Von diesen waren TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 nicht nur auf transkriptioneller Ebene im Lungengewebe nachweisbar, sondern auch die Kanalproteine immunhistochemisch in Zellpopulationen peripherer Atemwege zu detektieren. Die Kanalproteine TRPC1, TRPC3 und TRPC4 konnten auf Epithelzellen und die strukturell und funktionell zu einer Untergruppe gehörenden Kanäle TRPC3 und TRPC6 auf glatten Muskelzellen der Bronchioli nachgewiesen werden. Bei letzteren ließ sich eine Aktivierung durch ein DAG-Analogon videomorphometrisch messen. Diese Experimente belegen erstmals eine Beteiligung von TRPC-Kanalproteinen am Kalziumeinstrom in einem organnahen Lungenmodell.

Die nach mAChR-Stimulation aktivierten TRPC-Kanalproteine scheinen an der Konstriktion peripherer Atemwege und damit maßgeblich an der Pathogenese obstruktiver Lungenerkrankungen beteiligt zu sein. Durch eine Modulation von TRPC-Kanälen ergeben sich möglicherweise zukünftig neue Zielgebiete pharmakologischer Interventionen.

7. Summary

In the lungs the most important neurogenic broncho-constrictor, acetylcholine (ACh), reacts with subtypes of muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) on smooth muscle cells and epithelial cells. Up to now there only existed data regarding the mAChR-mediated effects and signal transduction pathways in central airways (e. g. trachea and main bronchi). With respect to their special importance in the pathogenesis of obstructive pulmonary disease, the present work concentrates on the peripheral airways that appear to be highly important for airway-resistance.

Experiments using vital lung-slice preparations gave a functional proof of the existence of mAChR in peripheral airways. The constriction of peripheral airways caused by muscarine induced a biphasic concentration-dependent response, characterized by a strong initial constriction and a sustained constriction that lasted as long as the agonist was present. Additional experiments indicated that the initial constriction depends on intracellular calcium release. Subsequent investigations concentrated on the channels that are responsible for the calcium influx which is responsible for the sustained constriction in peripheral airways. By using the antagonist Verapamil the participation of specific, voltage operated calcium channels (VOCCs) was excluded. However, a group of voltage insensitive calcium channels (VICCs) – the TRP channel proteins – showed to be interesting candidates that might mediate the calcium influx into smooth muscle cells of peripheral airways. Out of these, TRPC1-, TRPC3-, TRPC4-, and TRPC6-proteins could be found on a transcriptional level in pulmonary tissue. Using immunohistochemistry, the existence of the channel proteins TRPC1, TRPC3 and TRPC4 could be demonstrated on epithelial cells, whereas TRPC3 and TRPC6 – both structurally as well as functionally belonging to the same subgroup – could be demonstrated on bronchiolar smooth muscle cells. The activation of the latter by the diacylglycerol analogon OAG and blockade of TRPC-channels by SKF 96365 could be measured by videomorphometry.

These experiments show - for the first time in an *ex-vivo*-lung-model - the participation of TRPC channel proteins on the mAChR-mediated constriction of peripheral airways. Given the important role of muscarinic cholinergic mechanism in pulmonary disease, these findings should be of considerable therapeutic relevance.

8. Literaturverzeichnis

1. **Abdel-Latif, A. A.** 1986. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev.* **38**:227-72.
2. **Abdel-Latif, A. A.** 2001. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med (Maywood).* **226**:153-63.
3. **Aeby, C.** 1880. Der Bronchialbaum der Säugetiere und des Menschen. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
4. **Alling, C., L. Gustavsson, J. E. Mansson, G. Benthin und E. Anggard** 1984. Phosphatidylethanol formation in rat organs after ethanol treatment. *Biochim Biophys Acta.* **793**:119-22.
5. **Andersson, R. G. und N. Grundstrom** 1987. Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms *Pharmacol Ther.* **32**:107-30.
6. **Arvidsson, U., M. Riedl, R. Elde und B. Meister** 1997. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol.* **378**:454-67.
7. **Bargmann, W.** 1977. Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Fischer, Stuttgart.
8. **Barnes, P. J., J. S. Karliner und C. T. Dollery** 1980. Human lung adrenoreceptors studied by radioligand binding. *Clin Sci (Lond).* **58**:457-61.
9. **Barnes, P. J.** 1993. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Eur Respir J.* **6**:328-31.
10. **Barnes, P. J.** 2001. New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pharmacol.* **1**:217-22.
11. **Baumgold, J. und P. H. Fishman** 1988. Muscarinic receptor-mediated increase in cAMP levels in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **154**:1137-43.
12. **Bazan-Perkins, B., V. Carbajal, B. Sommer, M. Macias-Silva, M. Gonzalez-Martinez, F. Valenzuela, E. E. Daniel und L. M. Montano** 1998. Involvement of different Ca²⁺ pools during the canine bronchial sustained contraction in

- Ca²⁺-free medium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **358**:567-73.
13. **Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall und B. A. Freeman** 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:1620-4.
 14. **Benninghoff A. D. D.** 2002. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 16. Auflage ed, vol. Band 1.
 15. **Berridge, M. J.** 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**:315-25.
 16. **Blottner, D. und H. G. Baumgarten** 1992. Nitric oxide synthetase (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: evidence from histochemistry, immunohistochemistry, and retrograde labeling. *J Comp Neurol.* **316**:45-55.
 17. **Boichot, E., V. Lagente, M. Paubert-Braquet und N. Frossard** 1993. Inhaled substance P induces activation of alveolar macrophages and increases airway responses in the guinea-pig. *Neuropeptides.* **25**:307-13.
 18. **Bowden, J. J. und I. L. Gibbins** 1992. Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea. *J Auton Nerv Syst.* **38**:1-19.
 19. **Boyden, E. A.** 1975. Development of the human lung. *Practice of Pediatrics.* **4**.
 20. **Bremerich, D. H., D. O. Warner, R. R. Lorenz, R. Shumway und K. A. Jones** 1997. Role of protein kinase C in calcium sensitization during muscarinic stimulation in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* **273**:L775-81.
 21. **Broeckaert, F. und A. Bernard** 2000. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy.* **30**:469-75.
 22. **Brooks, R. C., K. D. McCarthy, E. G. Lapetina und P. Morell** 1989. Receptor-stimulated phospholipase A₂ activation is coupled to influx of external calcium and not to mobilization of intracellular calcium in C62B glioma cells. *J Biol Chem.* **264**:20147-53.

23. **Buckley, N. J., E. C. Hulme und N. J. Birdsall** 1990. Use of clonal cell lines in the analysis of neurotransmitter receptor mechanisms and function. *Biochim Biophys Acta*. **1055**:43-53.
24. **Campbell, S. C.** 2000. Clinical aspects of inhaled anticholinergic therapy. *Respir Care*. **45**:864-7.
25. **Canning, B. J. und A. Fischer** 1997. Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *Am J Physiol*. **272**:L731-8.
26. **Carraway, R. E., X. Gui und D. E. Cochrane** 2003. Ca²⁺ channel blockers enhance neurotensin (NT) binding and inhibit NT-induced inositol phosphate formation in prostate cancer PC3 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. **307**:640-50.
27. **Caulfield, M. P.** 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*. **58**:319-79.
28. **Chand, N., W. Diamantis, T. P. Mahoney und R. D. Sofia** 1988. Phospholipase A2 induced airway hyperreactivity to cooling and acetylcholine in rat trachea: pharmacological modulation. *Br J Pharmacol*. **94**:1057-62.
29. **Chapman, R. W., S. Tozzi und W. Kreutner** 1988. Antibronchoconstrictor activity of the intracellular calcium antagonist HA 1004 in guinea pigs. *Pharmacology*. **37**:187-94.
30. **Cheung, A., J. M. Polak, F. E. Bauer, A. Cadieux, N. D. Christofides, D. R. Springall und S. R. Bloom** 1985. Distribution of galanin immunoreactivity in the respiratory tract of pig, guinea pig, rat, and dog. *Thorax*. **40**:889-96.
31. **Clapham, D. E., C. Montell, G. Schultz und D. Julius** 2003. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. **55**:591-6.
32. **Clara, M.** 1937. Zur Histologie des bronchial epithels. *Mikroskop. Anat. Forsch*. **41**:321.
33. **Coburn, R. F. und T. Tomita** 1973. Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Am J Physiol*. **224**:1072-80.
34. **Coleridge, J. C. und H. M. Coleridge** 1984. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. **99**:1-110.
35. **Conklin, B. R., M. R. Brann, N. J. Buckley, A. L. Ma, T. I. Bonner und J. Axelrod** 1988. Stimulation of arachidonic acid release and inhibition of

- mitogenesis by cloned genes for muscarinic receptor subtypes stably expressed in A9 L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**:8698-702.
36. **Corompt, E., G. Bessard, S. Lantuejoul, E. Naline, C. Advenier und P. Devillier** 1998. Inhibitory effects of large Ca^{2+} -activated K^{+} channel blockers on beta-adrenergic- and NO-donor-mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **357**:77-86.
 37. **Corteling, R. L., S. Li, J. Giddings, J. Westwick, C. Poll und I. P. Hall** 2003. Expression of Trpc6 and Related Trp Family Members in Human Airway Smooth Muscle and Lung Tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **18**:18.
 38. **Crimi, N. und A. Mistretta** 1989. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of airways. *Eur Respir J Suppl*. **6**:508s-511s.
 39. **Cuthbert, N. J., P. J. Gardiner, K. Nash und C. T. Poll** 1994. Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am J Physiol*. **266**:L620-7.
 40. **Dale, H.** 1935. Pharmacology and nerve endings. *Proc. R. Soc. Med*. **28**:319-332.
 41. **Dalsgaard, C. J. und J. M. Lundberg** 1984. Evidence for a spinal afferent innervation of the guinea pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. *Neurosci Lett*. **45**:117-22.
 42. **Dandurand, R. J., C. G. Wang, N. C. Phillips und D. H. Eidelman** 1993. Responsiveness of individual airways to methacholine in adult rat lung explants. *J Appl Physiol*. **75**:364-72.
 43. **de Rada, O. D., A. C. Villaro, L. M. Montuenga, A. Martinez, D. R. Springall und J. M. Polak** 1993. Nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in human and porcine respiratory tract. *Neurosci Lett*. **162**:121-4.
 44. **Denys, A., V. Aires, A. Hichami und N. A. Khan** 2004. Thapsigargin-stimulated MAP kinase phosphorylation via CRAC channels and PLD activation: inhibitory action of docosahexaenoic acid. *FEBS Lett*. **564**:177-82.
 45. **Dey, R. D., W. A. Shannon, Jr. und S. I. Said** 1981. Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. *Cell Tissue Res*. **220**:231-8.

46. **Dey, R. D., J. Hoffpauir und S. I. Said** 1988. Co-localization of vasoactive intestinal peptide- and substance P-containing nerves in cat bronchi. *Neuroscience*. **24**:275-81.
47. **Dreja, K., A. Bergdahl und P. Hellstrand** 2001. Increased store-operated Ca^{2+} entry into contractile vascular smooth muscle following organ culture. *J Vasc Res*. **38**:324-31.
48. **Duncker, H. R.** 1985. *Der Atemapparat (Apparatus respiratorius)*. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
49. **Escolar, J. D., M. A. Escolar, J. Guzman und M. Roques** 2003. Morphological hysteresis of the small airways. *Histol Histopathol*. **18**:19-26.
50. **Esqueda, E. E., E. H. Gerstin, Jr., M. T. Griffin und F. J. Ehlert** 1996. Stimulation of cyclic AMP accumulation and phosphoinositide hydrolysis by M3 muscarinic receptors in the rat peripheral lung. *Biochem Pharmacol*. **52**:643-58.
51. **Fasolato, C., B. Innocenti und T. Pozzan** 1994. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci*. **15**:77-83.
52. **Felder, C. C., P. Dieter, J. Kinsella, K. Tamura, R. Y. Kanterman und J. Axelrod** 1990. A transfected m5 muscarinic acetylcholine receptor stimulates phospholipase A2 by inducing both calcium influx and activation of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther*. **255**:1140-7.
53. **Felder, C. C., H. L. Williams und J. Axelrod** 1991. A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein G_i that amplifies ATP-mediated arachidonic acid release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:6477-80.
54. **Felder, C. C., D. Singer-Lahat und C. Mathes** 1994. Voltage-independent calcium channels. Regulation by receptors and intracellular calcium stores. *Biochem Pharmacol*. **48**:1997-2004.
55. **Felder, C. C.** 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J*. **9**:619-25.
56. **Fischer, A., W. Kummer, J. Y. Couraud, D. Adler, D. Branscheid und C. Heym** 1992. Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea. *Lab Invest*. **67**:387-93.

57. **Fontan, J. J., D. N. Cortright, J. E. Krause, C. R. Velloff, V. V. Karpitskyi, T. W. Carver, Jr., S. D. Shapiro und B. N. Mora** 2000. Substance P and neurokinin-1 receptor expression by intrinsic airway neurons in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **278**:L344-55.
58. **Forrest, J. B. L., R.M.K.W. Lee** 1991. The bronchial wall integrated form and function. In: *The lung* (Crystal, R. G., J. B. West, eds.), Raven Press, New York, pp. 729-39.
59. **Freichel, M., R. Vennekens, J. Olausson, M. Hoffmann, C. Muller, S. Stolz, J. Scheunemann, P. Weissgerber und V. Flockerzi** 2004. Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem Biophys Res Commun.* **322**:1352-8.
60. **Fryer, A. D. und E. E. el-Fakahany** 1990. Identification of three muscarinic receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists. *Life Sci.* **47**:611-8.
61. **Fryer, A. D. und D. B. Jacoby** 1998. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.* **158**:S154-60.
62. **Garssen, J., H. Van Loveren, C. M. Gierveld, H. Van der Vliet und F. P. Nijkamp** 1993. Functional characterization of muscarinic receptors in murine airways. *Br J Pharmacol.* **109**:53-60.
63. **Gerthoffer, W. T.** 1991. Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am J Physiol.* **261**:L15-28.
64. **Gray, P. R. und H. W. Mitchell** 1996. Effect of diameter on force generation and responsiveness of bronchial segments and rings. *Eur Respir J.* **9**:500-5.
65. **Greenberg, S. S., A. Johns, J. Kleha, J. Xie, Y. Wang, J. Bianchi und K. Conley** 1994. Phenol red is a thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor antagonist in canine lingual arteries and human platelets. *J Pharmacol Exp Ther.* **268**:1352-61.
66. **Gudermann, T., T. Hofmann, M. Mederos y Schnitzler und A. Dietrich** 2004. Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found Symp.* **258**:103-18; discussion 118-22, 155-9, 263-6.
67. **Guillemain, I. und B. Rossignol** 1992. Evidence for receptor-linked activation of phospholipase D in rat parotid glands. Stimulation by carbamylcholine, PMA and calcium. *FEBS Lett.* **314**:489-92.

68. **Haberberger, R., M. Schemann, H. Sann und W. Kummer** 1997. Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. *J Appl Physiol.* **82**:426-34.
69. **Halayko, A. J., B. Camoretti-Mercado, S. M. Forsythe, J. E. Vieira, R. W. Mitchell, M. E. Wylam, M. B. Hershenson und J. Solway** 1999. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol.* **276**:L197-206.
70. **Hardie, R. C. und B. Minke** 1992. The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron.* **8**:643-51.
71. **Hardie, R. C. und B. Minke** 1993. Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci.* **16**:371-6.
72. **Hardie, R. C. und B. Minke** 1995. Phosphoinositide-mediated phototransduction in Drosophila photoreceptors: the role of Ca²⁺ and trp. *Cell Calcium.* **18**:256-74.
73. **Harteneck, C., T. D. Plant und G. Schultz** 2000. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**:159-66.
74. **Held, H. D., C. Martin und S. Uhlig** 1999. Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *Br J Pharmacol.* **126**:1191-9.
75. **Helke, C. J., J. E. Krause, P. W. Mantyh, R. Couture und M. J. Bannon** 1990. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *Faseb J.* **4**:1606-15.
76. **Hirche, H.** 1994. Muskulatur, Physiologie. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
77. **Hislop, A. A., J. C. Mak, J. A. Reader, P. J. Barnes und S. G. Haworth** 1998. Muscarinic receptor subtypes in the porcine lung during postnatal development. *Eur J Pharmacol.* **359**:211-21.
78. **Hofmann, T., A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann und G. Schultz** 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* **397**:259-63.
79. **Horsfield, K.** 1991. Pulmonary airways and blood vessels considered as confluent trees. In: *The lung* (Crystal, R. G., J. B. West, eds.), Raven Press, New York, pp. 721-27.

80. **Hua, X. Y., E. Theodorsson-Norheim, E. Brodin, J. M. Lundberg und T. Hokfelt** 1985. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept.* **13**:1-19.
81. **Huie, R. E. und S. Padmaja** 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* **18**:195-9.
82. **Hulme, E. C., N. J. Birdsall und N. J. Buckley** 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **30**:633-73.
83. **Ignarro, L. J.** 1992. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans.* **20**:465-9.
84. **Irvine, R. F.** 1992. Inositol phosphates and Ca²⁺ entry: toward a proliferation or a simplification? *Faseb J.* **6**:3085-91.
85. **Itoh, T., A. Suzuki und Y. Watanabe** 1994. Effect of a peptide inhibitor of protein kinase C on G-protein-mediated increase in myofilament Ca(2+)-sensitivity in rabbit arterial skinned muscle. *Br J Pharmacol.* **111**:311-7.
86. **Ito, S., H. Kume, H. Honjo, I. Kodama, H. Katoh, H. Hayashi und K. Shimokata** 2004. ML-9, a myosin light chain kinase inhibitor, reduces intracellular Ca²⁺ concentration in guinea pig trachealis. *Eur J Pharmacol.* **486**:325-33.
87. **Iwamoto, I., N. Nakagawa, H. Yamazaki, A. Kimura, H. Tomioka und S. Yoshida** 1993. Mechanism for substance P-induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regul Pept.* **46**:228-30.
88. **Janeway, C. A. und P. Travers** 1997. Immunologie. zweite Auflage ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
89. **Janssen, L. J.** 1996. Acetylcholine and caffeine activate Cl⁻ and suppress K⁺ conductances in human bronchial smooth muscle. *Am J Physiol.* **270**:L772-81.
90. **Janssen, L. J., M. Premji, H. Lu-Chao, G. Cox und S. Keshavjee** 2000. NO(+) but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal Ca(2+). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **278**:L899-905.
91. **Jones, S. V.** 1992. m4 muscarinic receptor subtype activates an inwardly rectifying potassium conductance in AtT20 cells. *Neurosci Lett.* **147**:125-30.

92. **Joos, G. F., P. R. Germonpre und R. A. Pauwels** 2000. Role of tachykinins in asthma. *Allergy*. **55**:321-37.
93. **Jung, S., R. Strotmann, G. Schultz und T. D. Plant** 2002. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **282**:C347-59.
94. **Junqueira, L. C., J. Carneiro, T. H. Schiebler, U. Peiper und F. Schneider** 1986. *Histologie*. Oxford University Press, Berlin, Heidelberg, New York, Toronto.
95. **Kajita, J. und H. Yamaguchi** 1993. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol*. **264**:L496-503.
96. **Kanoh, H., Y. Kanaho und Y. Nozawa** 1992. Pertussis toxin-insensitive G protein mediates carbachol activation of phospholipase D in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Neurochem*. **59**:1786-94.
97. **Karlsson, J. A., M. J. Finney, C. G. Persson und C. Post** 1984. Substance P antagonists and the role of tachykinins in non-cholinergic bronchoconstriction. *Life Sci*. **35**:2681-91.
98. **Klapproth, H., T. Reinheimer, J. Metzen, M. Munch, F. Bittinger, C. J. Kirkpatrick, K. D. Hohle, M. Schemann, K. Racke und I. Wessler** 1997. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. **355**:515-23.
99. **Kneussl, M. P. und J. B. Richardson** 1978. Alpha-adrenergic receptors in human and canine tracheal and bronchial smooth muscle. *J Appl Physiol*. **45**:307-11.
100. **Koblinger, L. und W. Hofmann** 1988. Stochastic morphological model of the rat lung. *Anat Rec*. **221**:533-9.
101. **Krumdiek C. L., J. dos Santos und K. J. Ho** 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Biochem Biophys Res Commun*. **104**:118-123.
102. **Kummer, W., A. Fischer, R. Kurkowski und C. Heym** 1992a. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience*. **49**:715-37.

103. **Kummer, W., A. Fischer, P. Mundel, B. Mayer, B. Hoba, B. Philippin und U. Preissler** 1992b. Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport*. **3**:653-5.
104. **Laitinen, A.** 1985. Autonomic innervation of the human respiratory tract as revealed by histochemical and ultrastructural methods. *Eur J Respir Dis Suppl*. **140**:1-42.
105. **Lambert, D. G., R. J. Wojcikiewicz, S. T. Safrany, E. M. Whitham und S. R. Nahorski** 1992. Muscarinic receptors, phosphoinositide metabolism and intracellular calcium in neuronal cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **16**:253-70.
106. **Levine, J. D., D. H. Collier, A. I. Basbaum, M. A. Moskowitz und C. A. Helms** 1985. Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. **12**:406-11.
107. **Li, C. G. und M. J. Rand** 1991. Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol*. **102**:91-4.
108. **Liao, C. F., W. P. Schilling, M. Birnbaumer und L. Birnbaumer** 1990. Cellular responses to stimulation of the M5 muscarinic acetylcholine receptor as seen in murine L cells. *J Biol Chem*. **265**:11273-84.
109. **Liman, E. R., D. P. Corey und C. Dulac** 1999. TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**:5791-6.
110. **Lindh, B., W. Staines, T. Hokfelt, L. Terenius und P. M. Salvaterra** 1986. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **83**:5316-20.
111. **Liscovitch, M.** 1991. Signal-dependent activation of phosphatidylcholine hydrolysis: role of phospholipase D. *Biochem Soc Trans*. **19**:402-7.
112. **Loewi, O.** 1921. Über humorale Übertragbarkeit der Herzerregung. *Pflügers Arch*. **189**: 239-242.
113. **Lulich, K. M., H. W. Mitchell und M. P. Sparrow** 1976. The cat lung strip as an in vitro preparation of peripheral airways: a comparison of beta-adrenoceptor agonists, autacoids and anaphylactic challenge on the lung strip and trachea. *Br J Pharmacol*. **58**:71-9.

114. **Lundberg, J. M., L. Terenius, T. Hokfelt und M. Goldstein** 1983. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett.* **42**:167-72.
115. **Lundberg, J. M., T. Hokfelt, C. R. Martling, A. Saria und C. Cuello** 1984. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* **235**:251-61.
116. **Lundberg, J. M., A. Hemsén, A. Rudehill, A. Harfstrand, O. Larsson, A. Sollevi, A. Saria, T. Hokfelt, K. Fuxe und B. B. Fredholm** 1988. Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience.* **24**:659-72.
117. **Ma, H. T., K. Venkatachalam, H. S. Li, C. Montell, T. Kurosaki, R. L. Patterson und D. L. Gill** 2001. Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca²⁺ entry channels. *J Biol Chem.* **276**:18888-96.
118. **Macklem, P. T.** 1998. The physiology of small airways. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**:S181-3.
119. **MacLagan, J. und P. J. Barnes** 1989. Muscarinic pharmacology of the airways. *Trends Pharmacol Sci.* **Suppl**:88-92.
120. **MacLagan, J., A. D. Fryer und D. Faulkner** 1989. Identification of M1 muscarinic receptors in pulmonary sympathetic nerves in the guinea-pig by use of pirenzepine. *Br J Pharmacol.* **97**:499-505.
121. **Mak, J. C., J. N. Baraniuk und P. J. Barnes** 1992. Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **7**:344-8.
122. **Mann, S. P.** 1971. The innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localization of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J.* **3**:319-31.
123. **Martin, C., S. Uhlig und V. Ullrich** 1996. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J.* **9**:2479-87.
124. **Martin, C., V. Ullrich und S. Uhlig** 2000. Effects of the thromboxane receptor agonist U46619 and endothelin-1 on large and small airways. *Eur Respir J.* **16**:316-23.

125. **Martin, R. J.** 2002. Therapeutic significance of distal airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **109**:S447-60.
126. **Martinson, E. A., I. Trilivas und J. H. Brown** 1990. Rapid protein kinase C-dependent activation of phospholipase D leads to delayed 1,2-diglyceride accumulation. *J Biol Chem.* **265**:22282-7.
127. **Matsui, M., D. Motomura, T. Fujikawa, J. Jiang, S. Takahashi, T. Manabe und M. M. Taketo** 2002. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci.* **22**:10627-32.
128. **McCarron, J. G., J. W. Craig, K. N. Bradley und T. C. Muir** 2002. Agonist-induced phasic and tonic responses in smooth muscle are mediated by InsP(3). *J Cell Sci.* **115**:2207-18.
129. **McDaniel, S. S., O. Platoshyn, J. Wang, Y. Yu, M. Sweeney, S. Krick, L. J. Rubin und J. X. Yuan** 2001. Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **280**:L870-80.
130. **McFadzean, I. und A. Gibson** 2002. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol.* **135**:1-13.
131. **Meurs, H., A. F. Roffel, J. B. Postema, A. Timmermans, C. R. Elzinga, H. F. Kauffman und J. Zaagsma** 1988. Evidence for a direct relationship between phosphoinositide metabolism and airway smooth muscle contraction induced by muscarinic agonists. *Eur J Pharmacol.* **156**:271-4.
132. **Mitchell, H. W. und M. P. Sparrow** 1994. Increased responsiveness to cholinergic stimulation of small compared to large diameter cartilaginous bronchi. *Eur Respir J.* **7**:298-305.
133. **Moncada, S., R. M. Palmer und E. A. Higgs** 1989. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans.* **17**:642-4.
134. **Montell, C.** 2001. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* **2001**:RE1.
135. **Nakakuki, S.** 1975. The new interpretation of the bronchial tree. *Proc. Japan Acad.* **51**:342-346.
136. **Nakakuki, S.** 1983. The bronchial tree and blood vessels of the rat lung. *Anat Anz.* **154**:305-12.

137. **Narath, A.** 1901. Der Bronchialbaum der Säugetiere und des Menschen. Heft 3. Nägele, Stuttgart.
138. **Nickel, R. S., A. Schummer und E. Seiferle** 1987. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. vol. 2. Paul Parey, Berlin, Hamburg.
139. **Nohr, D., L. E. Eiden, and E. Weihe** 1995. Coexpression of vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in parasympathetic neurons of the rhesus monkey lung. *Neurosci Lett.* **199**:25-8.
140. **Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto und Y. Mori** 1999. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca^{2+} -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* **274**:27359-70.
141. **Olianas, M. C. und P. Onali** 1992. Properties of muscarinic-stimulated adenylate cyclase activity in rat olfactory bulb. *J Neurochem.* **58**:1723-9.
142. **Pack, R. J., L. H. Al-Ugaily und G. Morris** 1981. The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat.* **132**:71-84.
143. **Pack, R. J. und P. S. Richardson** 1984. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J Anat.* **138**:493-502.
144. **Parekh, A. B. und R. Penner** 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* **77**:901-30.
145. **Park, S. und H. Rasmussen** 1985. Activation of tracheal smooth muscle contraction: synergism between Ca^{2+} and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:8835-9.
146. **Partanen, M., A. Laitinen, A. Hervonen, M. Toivanen und L. A. Laitinen** 1982. Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry.* **76**:175-88.
147. **Peiper, U., S. C. Knipp, B. Thies und R. Henke** 1996. Activation of protein kinase C accelerates contraction kinetics of airway smooth muscle. *Pflugers Arch.* **432**:R47-52.

148. **Peretz, A., C. Sandler, K. Kirschfeld, R. C. Hardie und B. Minke** 1994. Genetic dissection of light-induced Ca^{2+} influx into *Drosophila* photoreceptors. *J Gen Physiol.* **104**:1057-77.
149. **Pfeil, U., R. V. Haberberger, K. S. Lips, L. Eberling, V. Grau und W. Kummer** 2003. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci.* **72**:2087-90.
150. **Phalen, R. F., H. C. Yeh, G. M. Schum und O. G. Raabe** 1978. Application of an idealized model to morphometry of the mammalian tracheobronchial tree. *Anat Rec.* **190**:167-76.
151. **Plopper, C. G., L. H. Hill und A. T. Mariassy** 1980. Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species. *Exp Lung Res.* **1**:171-80.
152. **Plopper, C. G., D. W. Wilson, J. L. Alley, S. J. Nishio und P. Nettesheim** 1983. Comparison of nonciliated tracheal epithel cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. *Exp Lung Res*:281-294.
153. **Plopper, C. G., J. G. Heidsiek, A. J. Weir, J. A. George und D. M. Hyde** 1989. Tracheobronchial epithelium in the adult rhesus monkey: a quantitative histochemical and ultrastructural study. *Am J Anat.* **184**:31-40.
154. **Popa, V. T., P. Somani und V. Simon** 1984. The effect of inhaled verapamil on resting bronchial tone and airway contractions induced by histamine and acetylcholine in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis.* **130**:1006-13.
155. **Pyne, N. J., M. W. Grady, D. Shehnaz, P. A. Stevens, S. Pyne, I. W. Rodger, M. Freissmuth und S. Palmer** 1992. Muscarinic blockade of beta-adrenoceptor-stimulated adenylyl cyclase: the role of stimulatory and inhibitory guanine-nucleotide binding regulatory proteins (Gs and Gi). *C. Br J Pharmacol.* **107**:881-7.
156. **Rand, M. J.** 1992. Nitrgergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **19**:147-69.
157. **Ranganathan, R. und C. F. Stevens** 1995. Arrestin binding determines the rate of inactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. *Cell.* **81**:841-8.

158. **Rapoport, R. M., M. B. Draznin und F. Murad** 1983. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. **306**:174-6.
159. **Reinheimer, T., P. Bernedo, H. Klapproth, H. Oelert, B. Zeiske, K. Racke und I. Wessler** 1996. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol*. **270**:L722-8.
160. **Reinheimer, T., T. Mohlig, S. Zimmermann, K. D. Hohle und I. Wessler** 2000. Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med*. **162**:534-8.
161. **Riccio, A., C. Mattei, R. E. Kelsell, A. D. Medhurst, A. R. Calver, A. D. Randall, J. B. Davis, C. D. Benham und M. N. Pangalos** 2002. Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem*. **277**:12302-9.
162. **Richardson, J. B.** 1977. The neural control of human tracheobronchial smooth muscle. *Asthma*, vol. 2. Academic Press Inc., New York.
163. **Rodger, I. W.** 1985. Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle. *Br J Clin Pharmacol*. **20**:255S-266S.
164. **Roffel, A. F., C. R. Elzinga und J. Zaagsma** 1990. Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol*. **3**:47-51.
165. **Rorstad O., H. Shirahase und M. Huang** 1993. Pharmacology of acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in perivascular nerves. In: *Vascular innervation and receptor mechanisms* (L. Edvinsson and R. Uddman, eds.) Academic Press Inc., San Diego, California, Part III, Chapter 11, pp. 221-43.
166. **Rossetti, M., J. P. Savineau, H. Crevel und R. Marthan** 1995. Role of protein kinase C in nonsensitized and passively sensitized human isolated bronchial smooth muscle. *Am J Physiol*. **268**:L966-71.
167. **Roux, E., M. Molimard, J. P. Savineau und R. Marthan** 1998. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*. **31**:349-56.
168. **Sandmann, J. und R. J. Wurtman** 1991. Stimulation of phospholipase D activity in human neuroblastoma (LA-N-2) cells by activation of muscarinic

- acetylcholine receptors or by phorbol esters: relationship to phosphoinositide turnover. *J Neurochem.* **56**:1312-9.
169. **Saria, A., C. R. Martling, Z. Yan, E. Theodorsson-Norheim, R. Gamse und J. M. Lundberg** 1988. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis.* **137**:1330-5.
 170. **Sato, K., R. Leposavic, N. G. Publicover, K. M. Sanders und W. T. Gerthoffer** 1994. Sensitization of the contractile system of canine colonic smooth muscle by agonists and phorbol ester. *J Physiol.* **481**:677-88.
 171. **Schaefer, M., T. D. Plant, A. G. Obukhov, T. Hofmann, T. Gudermann und G. Schultz** 2000. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem.* **275**:17517-26.
 172. **Shapiro, M. S., M. D. Loose, S. E. Hamilton, N. M. Nathanson, J. Gomeza, J. Wess und B. Hille** 1999. Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca(2+) channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:10899-904.
 173. **Shimosegawa, T., H. D. Foda und S. I. Said** 1990. [Met]enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerves in guinea-pig and rat lungs: distribution, origin, and co-existence with vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity. *Neuroscience.* **36**:737-50.
 174. **Shioya, T., J. Solway, N. M. Munoz, M. Mack und A. R. Leff** 1987. Distribution of airway contractile responses within the major diameter bronchi during exogenous bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis.* **135**:1105-11.
 175. **Skoogh, B. E., J. Lothwall, C. G. Lofdahl und N. Svedmyr** 1989. Classification of beta-adrenoceptors in ferret tracheal smooth muscle by pharmacological responses. *Pulm Pharmacol.* **1**:173-7.
 176. **Spicuzza, L., L. Basile, M. G. Belvisi, S. Bellofiore, M. G. Matera, M. Cazzola und G. U. Di Maria** 2002. The protective role of epithelium-derived nitric oxide in isolated bovine trachea. *Pulm Pharmacol Ther.* **15**:357-62.
 177. **Springall, D. R., A. Cadieux, H. Oliveira, H. Su, D. Royston und J. M. Polak** 1987. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J Auton Nerv Syst.* **20**:155-66.
 178. **Starck, D.** 1975. Embryologie. Thieme, Stuttgart.

179. **Starke, K.** 1996. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage ed. Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford.
180. **Staub, N. C.** 1963. The independence of pulmonary structure and function. *Anaesthesiology*. **24**:831-854.
181. **Stengel, P. W., J. Gomeza, J. Wess und M. L. Cohen** 2000. M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. **292**:877-85.
182. **Stengel, P. W., M. Yamada, J. Wess und M. L. Cohen** 2002. M(3)-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **282**:R1443-9.
183. **Stowers, R. S., L. J. Megeath, J. Gorska-Andrzejak, I. A. Meinertzhagen und T. L. Schwarz** 2002. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. *Neuron*. **36**:1063-77.
184. **Strek, M. E., A. Garland, C. Abrahams, A. R. Leff und S. R. White** 1992. Direct effects and augmentation of airway smooth muscle contraction caused by phospholipase A2. *Am Rev Respir Dis*. **145**:1463-8.
185. **Stretton, D.** 1991. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **18**:675-84.
186. **Suidan, H. S., R. D. Murrell und A. M. Tolkovsky** 1991. Carbachol and bradykinin elevate cyclic AMP and rapidly deplete ATP in cultured rat sympathetic neurons. *Cell Regul*. **2**:13-25.
187. **Takahashi, N., H. Aizawa, S. Fukuyama, H. Inoue, S. Nishima und N. Hara** 2000. Thapsigargin, a Ca(2+)-ATPase inhibitor, relaxes guinea pig tracheal smooth muscle by producing epithelium-dependent relaxing factors. *Eur J Pharmacol*. **410**:61-8.
188. **Takata, Y., Y. Nishimura, H. Maeda und M. Yokoyama** 1999. Phospholipase A2 augments contraction and intracellular calcium mobilization through thromboxane A2 in bovine tracheal smooth muscle. *Eur Respir J*. **14**:396-404.
189. **Takuwa, Y., N. Takuwa und H. Rasmussen** 1987. Measurement of cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in bovine tracheal smooth muscle using aequorin. *Am J Physiol*. **253**:C817-27.

190. **Tallet, D., P. Del Soldato, N. Oudart und J. L. Burgaud** 2002. NO-steroids: potent anti-inflammatory drugs with bronchodilating activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **290**:125-30.
191. **Tesfai, Y., H. M. Brereton und G. J. Barritt** 2001. A diacylglycerol-activated Ca²⁺ channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. *Biochem J.* **358**:717-26.
192. **Tilley, S. L., J. M. Hartney, C. J. Erikson, C. Jania, M. Nguyen, J. Stock, J. McNeisch, C. Valancius, R. A. Panettieri, Jr., R. B. Penn und B. H. Koller** 2003. Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E₂ on airway tone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **284**:L599-606.
193. **Tiruppathi, C., M. Freichel, S. M. Vogel, B. C. Paria, D. Mehta, V. Flockerzi und A. B. Malik** 2002. Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res.* **91**:70-6.
194. **Uddman, R., F. Sundler und P. Emson** 1984. Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.* **237**:321-7.
195. **Valerius, K. P.** 1996. Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents. *Morphology*:291-297.
196. **Van Geldre, L. A. und R. A. Lefebvre** 2004. Nitroergic relaxation in rat gastric fundus: influence of mechanism of induced tone and possible role of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Life Sci.* **74**:3259-74.
197. **Venkatachalam, K., H. T. Ma, D. L. Ford und D. L. Gill** 2001. Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP₃ knockout cells. *J Biol Chem.* **276**:33980-5.
298. **Verastegui, C., A. Prada Oliveira, J. Fernandez-Vivero, A. Romero und J. M. de Castro** 1997. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in adult mouse lung. *Eur J Histochem.* **41**:119-26.
299. **Watson, E. L., J. C. Singh, C. McPhee, J. Beavo und K. L. Jacobson** 1990. Regulation of cAMP metabolism in mouse parotid gland by cGMP and calcium. *Mol Pharmacol.* **38**:547-53.
200. **Weibel, E. R.** 1963. *Morphometrie of the human lung.* Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

201. **Weibel, E. R.** 1991. Design of airways and blood vessels considered as branching trees. Raven Press, New York.
202. **Wessler, I., C. J. Kirkpatrick und K. Racke** 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther.* **77**:59-79.
203. **Wessler, I., C. J. Kirkpatrick und K. Racke** 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **26**:198-205.
204. **Wessler, I., E. Roth, C. Deutsch, P. Brockerhoff, F. Bittinger, C. J. Kirkpatrick und H. Kilbinger** 2001. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol.* **134**:951-6.
205. **Wessler, I. K. und C. J. Kirkpatrick** 2001. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* **14**:423-34.
206. **Widdicombe, J. G.** 1998. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med.* **158**:S171-5.
207. **Wilson, D. W., C. G. Plopper und D. M. Hyde** 1984. The tracheobronchial epithelium of the bonnet monkey (*Macaca radiata*): a quantitative ultrastructural study. *Am J Anat.* **171**:25-40.
208. **Yakubu, M. A. und C. W. Leffler** 2002. L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in cerebral microvascular endothelial cells and ET-1 biosynthesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* **283**:C1687-95. Epub 2002 Aug 22.
209. **Zaagsma, J., A. F. Roffel und H. Meurs** 1997. Muscarinic control of airway function. *Life Sci.* **60**:1061-8.
210. **Zhang, L. und D. Saffen** 2001. Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J Biol Chem.* **276**:13331-9.
211. **Zhu, X., M. Jiang, M. Peyton, G. Boulay, R. Hurst, E. Stefani und L. Birnbaumer** 1996. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell.* **85**:661-71.

9. Anhang

9.1 Eigene Veröffentlichungen

Struckmann, N., S. Schwering, S. Wiegand, A. Gschnell, M. Yamada, W.

Kummer, J. Wess und R. V. Haberberger 2003. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* **64**:1444-51.

Danksagung

Allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich sehr herzlich.

Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Überlassung des Themas und die vom Institut gewährten Mittel und Möglichkeiten.

Meinem Betreuer, Dr. Rainer Haberberger, danke ich für die hervorragende Einarbeitung in das Arbeitsgebiet und die intensive Betreuung während der gesamten Zeit der Arbeit. Neben der unermüdlichen fachlichen Unterstützung möchte ich mich bei ihm auch für das freundschaftliche Verhältnis bedanken.

Prof. Dr. Martin Bergmann danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit gegenüber dem Fachbereich Veterinärmedizin der JLU Gießen zu vertreten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Labore der Anatomie I des Fachbereichs Humanmedizin der JLU Gießen danke ich für die Unterstützung bei der Planung der Versuche und die vielen guten Ratschläge in einer mehr als netten Atmosphäre.

Besonderer Dank gebührt hier Dr. Renate Paddenberg für die hervorragende Einarbeitung im Labor sowie Anna Goldenberg und Petra Faulhammer für die stete Hilfestellung und unermüdliche Geduld bei allen aufgetretenen Problemen im Labor.

Auch Silke Wiegand gebührt besonderer Dank für ihre stete Hilfe bei Problemen bei der Durchführung der Experimente. Sie und Petra Hartmann haben durch ihre humorvolle Art und ihre über diese Arbeit hinaus reichende Freundschaft entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Karola Michael bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung von Grafiken und computertechnischen Problemen.

Auch meinen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meinen lieben Eltern für die jederzeit vorhandene finanzielle und seelische Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit. Mein Freund Tobias Eisenberg war es, der mich in guten und in schlechten Zeiten immer wieder motiviert hat. Für seine ständige, unermüdliche Unterstützung und Geduld, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre, danke ich ihm von ganzem Herzen.